Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. Kewitz

Bestimmung der Zuckersäureausscheidung im 24-Stunden-urin als „in vivo" Parameter der Aktivität arzneimittelabbauender Enzyme bei Probanden unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Phenobarbital bzw. Clemastine (Tavegil^{R})

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Saalfrank
aus Rehau

1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549607_0089

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. Kewitz

Bestimmung der Zuckersäureausscheidung im 24-Stunden-urin als „in vivo" Parameter der Aktivität arzneimittelabbauender Enzyme bei Probanden unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Phenobarbital bzw. Clemastine (Tavegil®)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Saalfrank
aus Rehau

Referent: Professor Dr. Hildebrandt
Korreferent: Professor Dr. Müller - Oerlinghausen

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 24.3.1977

Inhaltsverzeichnis

Seite

A) EINLEITUNG UND PROBLEMDARSTELLUNG ANHAND DER LITERATUR

I) Der Arzneimittelstoffwechsel in der Leber 5

II) Beeinflussung des Arzneimittelstoffwechsels durch verschiedene Faktoren 8

III) Mögliche klinische Konsequenzen des veränderten Arzneimittelstoffwechsels 12

IV) Mögliche Bestimmung der quantitativen Veränderungen der Kapazität des Arzneimittelstoffwechsels 13

V) Messung der Zuckersäureausscheidung im Urin als "in vivo" Parameter des Arzneimittelstoffwechsels 15

VI) Problemstellung 22

B) MATERIAL

I) Material für die enzymatische Bestimmung der Zuckersäure 23

II) Material für die chemische Zuckersäurebestimmung 24

III) Material für die ß-Glucuronidasebestimmung im Serum 25

IV) Gewinnung des Untersuchungsmaterials Durchführung der Probandenversuche 25

C) METHODIK

I) Die enzymatische Methode der Zuckersäurebestimmung nach Marsh 28

II) Methode der chemischen Zuckersäurebestimmung im Urin nach Ishidate 31

III) Die Bestimmung von ß-Glucuronidase im Serum nach Szasz 34

IV) Statistische Auswertung 34

D) ERGEBNISSE

I) Modifikation der Methode der Zuckersäurebestimmung nach Marsh 36

II) Ergebnisse der chemischen Zuckersäurebestimmung 65

Seite

III) Ergebnisse der Probandenversuche

1) Zuckersäurebestimmung in der
a) Placebogruppe 69

b) Clemastinegruppe 70

c) Phenobarbitalgruppe 71

2) Bestimmung der ß-Glucuronidase im Probandenserum 71

IV) Ergebnisse der Versuchsreihe II 73

V) Statistische Auswertung

a) Versuch I 73

b) Versuch II 75

VI) Vergleich der Ergebnisse

a) Versuch I 76

b) Vergleich der Ergebnisse der beiden Phenobarbitalgruppen aus Versuch I u. II 78

c) Vergleich der Zuckersäurebestimmung mit anderen Parametern einer Induktion hydroxylierender Enzyme der Leber 82

E) DISKUSSION

I) Diskussion der Methoden 84

II) Vergleich der Zuckersäureausscheidung aller Probanden unter Kontrollbedingungen mit den in der Literatur angegebenen 85

III) Vergleich der Werte der Zuckersäureausscheidung im Urin nach Phenobarbitalbehandlung mit den Werten aus der Literatur 87

IV) Mögliche Ursachen einer Erhöhung der Zuckersäureausscheidung im Urin 89

V) Diagnostische Aussagekraft von "in vivo" Parametern 92

F) ZUSAMMENFASSUNG 94

G) LITERATURVERZEICHNIS 96

A) EINLEITUNG UND PROBLEMDARSTELLUNG ANHAND DER LITERATUR

I) Der Arzneimittelstoffwechsel in der Leber

Die Wirkungsdauer eines Arzneimittels wird weitgehend durch die Geschwindigkeit bestimmt, mit der es aus dem Körper entfernt wird. Diese Eliminationsgeschwindigkeit ist von vielen Faktoren abhängig, zu denen die Plasmabindung des Medikaments, die Nierenfunktion und nicht zuletzt die Geschwindigkeit gehört, mit der es abgebaut wird.

Die meisten Pharmaka werden zu anderen Verbindungen abgebaut, bevor sie den Körper über Galle, Stuhl, Urin oder Atemluft verlassen. Besonders dann, wenn sie über die Nieren ausgeschieden werden, müssen lipoidlösliche Medikamente in eine wasserlösliche Form übergeführt werden. Sonst würden sie aufgrund ihrer guten Membranpermeabilität und des im distalen Tubulus durch die Konzentrierungsarbeit der Niere zum Blut hin gerichteten Diffusionsgradienten im Körper zurückgehalten werden (62).

Die für diesen Stoffwechsel notwendigen Enzyme befinden sich in der Hauptsache in der Leber, in kleineren Mengen auch in Niere, Lunge und Gastrointestinaltrakt (62). In der Leberzelle sind die Enzymsysteme vor allem an die Strukturen des glatten endoplasmatischen Reticulums gebunden. Dies ist ein elektronenmikroskopisch sichtbares, aus Phospholipidmembranen aufgebautes, weitverzweigtes Röhren- und Hohlraumsystem. Diese Strukturen werden auch als Mikrosomen bezeichnet. Das sind die vesiculären und granulären Zellbestandteile, die nach Abzentrifugieren von Kernen, Mitochondrien und Lysosomen zurückbleiben (62).

Nach Williams (70) können die von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen aufgrund ihres Charakters und der biologischen Aktivität ihrer Produkte in zwei Phasen eingeteilt werden. Die Reaktionen der Phase I können zu einer Inaktivierung einer wirksamen oder zur Aktivierung einer unwirksamen Substanz führen. Auch kann ein wirksames Pharmakon in ein anderes ebenfalls wirksames

übergeführt werden. Durch die Reaktionen der Phase II entstehen meist gut wasserlösliche und im allgemeinen inaktive Ausscheidungsprodukte. Die Phase I umfaßt Hydrolyse, Reduktion und Oxydation, die Phase II Synthesereaktionen, wie Konjugation mit Säuren, vor allem Glucoronsäure (70).

Enzymatisch hydrolysiert werden Ester und Säureamide (62). Die reduzierenden Enzyme befinden sich sowohl im endoplasmatischen Reticulum als auch im Zytoplasma der Leberzelle. Sie werden für Reaktionen wie die Azoreduktion benötigt, wodurch z.B. das unwirksame Prontosil, das erste bekannte Sulfonamid, in das wirksame Sulfanilamid übergeführt wird.(62).

Der wichtigste Weg,ein Pharmakon wasserlöslicher zu machen, ist die enzymatische Hydroxylierung. Die Oxydation aliphatischer und aromatischer Verbindungen ohne polarisierende Gruppen geschieht in den Lebermikrosomen mit Hilfe molekularen Sauerstoffs (69). Dazu stehen der Leberzelle Enzymsysteme zur Verfügung, die Flavinenzyme und Reticulochrome, Cytochrom P450 und Cytochrom b_5 enthalten (69). Zur Hydroxylierung benötigt diese Monooxygenase hauptsächlich Nicotinadenindinucleotidphosphat($NADPH_2$) als Elektronendonator und molekularen Sauerstoff. Dieser reagiert aufgrund seiner Elektronenkonfiguration (2 unpaarige Elektronen) nicht mit stabilen organischen Verbindungen (30); er muß erst "aktiviert" werden. Dies geschieht wahrscheinlich hauptsächlich über eine reversible Komplexbindung mit dem Eisen-(II)-ion des Cytochroms (30). Den Mechanismus der Monooxygenasereaktion stellt man sich so vor, daß ein Sauerstoffatom das mit dem Enzym komplex gebundene Substrat (RH) oxydiert und das andere zu Wasser reduziert wird:

$$NADPH + H^+ + O_2 + RH \xrightarrow[\text{Cytochrom P 450}]{\text{Flavinenzym}} NADP^+ + H_2O + ROH$$

Dieses Enzymsystem wird als Monooxygenase bezeichnet, da nur ein Atom des molekularen Sauerstoffs in das Substrat eingeführt wird. Der Begriff "mixed function oxidase", der auch verwendet wird, leitet sich von den zwei Funktionen des Sauerstoffs als oxydierendes und als oxygenierendes Agens ab. Cytochrom P 450 katalysiert diese Reaktion durch Bindung und Aktivierung des Sauerstoffs als sog. "Terminale Oxidase" (69).

Cooper und Mitarbeiter (16) entdeckten, daß dieses Enzymsystem an der Hydroxylierung von Steroiden in der Nebennierenrinde beteiligt ist. Sie bewiesen die ebenfalls wichtige Funktion des Cytochrom P 450 bei der Pharmakahydroxylierung, indem sie zeigten, daß die Oxydation von Codein, 4-Monoaminoantipyrin und Acetanilid in den Lebermikrosomen durch Kohlenmonoxid gehemmt wird. Kohlenmonoxid inaktiviert Cytochrom P 450 dadurch, daß es seine freien Bindungsstellen am Hämeisen besetzt. Diese Hemmung kann durch monochromatisches Licht der Wellenlänge 450 nm oder Zufuhr von Sauerstoff, die das Kohlenmonoxid von diesen Bindungsstellen wieder ablösen, aufgehoben werden (16). Mit Hilfe der oxydierenden Enzymsysteme werden Reaktionen wie die Hydroxylierung aromatischer Verbindungen (Phenobarbital), N-Dealkylierung (Aminopyrin zu Aminoantipyrin), O-Dealkylierung, N-Oxydation, Sulfoxydation, Epoxydation u.a. durchgeführt (62).

In der Phase II können durch Oxydation polarer gewordene und auch nicht metabolisierte Substanzen, aber auch körpereigene Verbindungen mit Hydroxyl-, Carboxyl-, Sulfhydril-, Amino- oder Iminogruppen durch Konjugation mit aktivierter Glucuronsäure noch wasserlöslicher gemacht werden (24). Eine stärkere Polarisierung wird auch durch Verbindungen mit Acetylgruppen, Schwefelsäure, Merkaptursäure (epoxydierte aromatische Verbindungen) und andere Gruppen erreicht. Auch diese Reaktionen finden im endoplasmatischen Reticulum der Leberzelle statt (70).

Die Bildung von Verbindungen mit Glucuronsäure, sog. Glucuronide, erfordert aktivierte Glucuronsäure, die Uridindiphosphatglucuronsäure (UDPGlucuronsäure), die aus UDPGlucose unter Einwirken der UDPGlucosedehydrogenase entsteht. UDPGlucose wird entweder aus Glucose-1-Phosphat und Uridintriphosphat oder aus UDPGalaktose mit Hilfe der entsprechenden Epimerase gebildet (Abb. 1, S.17). Unter Katalyse des Enzyms UDPGlucuronyltransferase (E.C. 2.4.1.17) ersetzt die Glucuronsäure bei Verbindungen, die ausgeschieden werden sollen, den Wasserstoff der oben angeführten chemischen Gruppen (24).

Beispiel:

$$R\text{-}OH + \text{UDPGlucuronsäure} \xrightarrow{\text{UDPGlucuronyltransferase}} R\text{-Glucuronid} + H_2O$$

R-OH: z.B. hydroxylierter Fremdstoff

Hinter der Bezeichnung UDPGlucuronyltransferase verbirgt sich eine unbekannte Anzahl eng verwandter Enzyme mit teilweise sich überkreuzender Spezifität (24).

Die meisten Pharmaka durchlaufen mehrere der hier aufgeführten Reaktionen, so Sulfonamide, die N-oxydiert, acetyliert und an Glucuronsäure gekoppelt werden (62).

II) Beeinflussung des Arzneimittelstoffwechsels durch verschiedene Faktoren

Die Aktivität der in den Arzneimittelstoffwechsel einbezogenen Enzyme kann durch verschiedene Faktoren beeinflußt werden. Einer dieser Faktoren ist das Alter. So ist das Neugeborene nicht in der Lage, lipoidlösliche Fremdstoffe in dem Maße mit Glucuronsäure zu konjugieren wie der Erwachsene. Eine wichtige Rolle dabei spielt die niedrige Aktivität der UDPGlucuronyltransferase (24). Pharmaka, die nach Glucuronidierung ausgeschieden werden, kumulieren daher eher, wie z.B. das Chloramphenicol, was dann zum sog. "Grau Syndrom" führen kann.

Auch der Ernährungszustand (Unterernährung, Vitamin- und Mineralienmangel) sowie die Zufuhr mit bestimmten Zusätzen versehener Nahrung oder durch Insektizide verunreinigter Lebensmittel können die Aktivität arzneimittelmetabolisierender Enzyme verändern (5). Steroidhormone sind für den Arzneimittelstoffwechsel von besonderer Bedeutung. So fehlt bei adrenalektomierten Ratten der normalerweise vorhandene Tagesrhythmus im Abbau von Pharmaka, der mit den Tagesschwankungen des Kortikosteroidspiegels in Beziehung gesetzt wurde (57). Untersuchungen an Schwangeren zeigten, daß im Urin mehr unveränderte und weniger demethylierte Stoffwechselprodukte von Phetidin und Promazin ausgeschieden werden, als bei nichtschwangeren Frauen. Durch Kontrazeptiva ist ebenfalls eine Beeinflussung des Arzneimittelstoffwechsels möglich (17).

Auch Medikamente können die Aktivität der Enzyme ihres Stoffwechsels oder anderer Pharmaka verändern.

Diese Veränderung kann im Sinne einer Hemmung oder im Sinne einer Stimulierung geschehen. Eine Hemmung kann durch Verabreichung von Proteinsynthesehemmstoffen, durch Protein-, Vitamin C Mangel und andere indirekt angreifende Komponenten erfolgen (43). Durch Medikamente und viele Fremdstoffe kann der Abbau eines anderen Medikaments kompetitiv oder allosterisch gehemmt werden (43). Eine Stimulierung des Metabolismus von Arzneimitteln kann durch Substratzufuhr bedingt sein. Durch Verabreichung von Substrat kann der Stoffwechsel bis zu einer Sättigungskinetik gesteigert werden. In einigen Fällen führt Substratzufuhr zu einer Stabilisierung des betreffenden Enzyms und damit zu einer Zunahme seiner Aktivität (29).

Die ersten, die einen stimulierenden Einfluß von Fremdstoffen auf die Aktivität der Enzyme des oxydativen Stoffwechsels in den Lebermikrosomen beobachteten, waren Brown, Miller und Miller (8). Sie stellten fest, daß die Mikrosomenfraktion aus Leberhomogenaten von Mäusen, die mit gewöhnlichem, ungereinigtem Hundefutter gefüttern worden waren, methylierte Aminoazofarbstoffe

(3-methyl-4mono-methyl-aminoazobenzen) schneller demethylierten als die von Mäusen, die gereinigtes Futter bekommen hatten. Als für diesen Effekt verantwortliche Substanzen isolierten sie aus dem Hundefutter Peroxide von Sterolen und polyzyklische Kohlenwasserstoffe, die wahrscheinlich durch den Vorgang des Konservierens und durch die Lagerung entstanden waren. Zugabe dieser Substanzen zu dem Reaktionsansatz hatte keinen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit (8).

Remmer (59) beschrieb eine Stimulierung des Arzneimittelstoffwechsels nach Phenobarbitalbehandlung. Bei seinen Versuchen stellte sich heraus, daß Verabreichung von Phenobarbital bei Ratten, Mäusen und Kaninchen die Dauer einer Hexobarbitalnarkose erheblich verkürzte. Hexobarbital wurde weiterhin "in vitro" von Leberhomogenaten phenobarbitalbehandelter Tiere schneller oxydiert als von denen unbehandelter Tiere. Auch die Demethylierung von Methylaminoantipyrin war beschleunigt. Ist eine Aktivitätssteigerung arzneimittelabbauender Enzyme Folge einer durch Medikamentengabe eingeleiteten verstärkten Synthese mikrosomalen Enzymproteins, spricht man von Enzyminduktion. Zur Aufklärung des Vorgangs der Enzyminduktion trugen besonders die Arbeiten von Conney und Mitarbeitern (11, 12, 13) und die von Remmer und Merker bei (60, 61).

Daß die Aktivitätssteigerung der Enzyme nach Phenobarbitalbehandlung auf einer verstärkten Neubildung von Enzymprotein beruht, zeigten Conney und Mitarbeiter, indem sie den stimulierenden Phenobarbitaleffekt durch gleichzeitige Verabreichung von Proteinsynthesehemmstoffen (DL-Äthionin (12), Puromycin (14)) aufhoben. "In vitro" Zugabe von Phenobarbital zum Reaktionsansatz ergab keine Veränderung (12). Damit war bewiesen, daß Phenobarbital nicht direkt, etwa als Aktivator an der Reaktion der mikrosomalen Enzyme teilnimmt. Weiterhin beobachteten Conney und Gilman (14) nach mehrtägiger Phenobarbitalapplikation bei Ratten eine Zunahme der Lebergröße und eine Zunahme des mikrosomalen Proteins um 39 % pro Gramm Leber.

Wichtige Erkenntnisse über den Vorgang der Enzyminduktion lieferten die biochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Remmer und Merker (61). Sie fanden nach wiederholten Phenobarbitalgaben bei Ratten eine Vermehrung der glatten Membranen des endoplasmatischen Reticulums. Dies ist mit einer Mengenzunahme zweier mikrosomaler Cytochrome, b 5 und P 450, verbunden, sowie mit einer Aktivitätssteigerung mehrerer in den Arzneimittelabbau einbezogener Enzyme, die ihren Sitz an diesen glatten Membranen haben.

Mittlerweile sind viele Substanzen bekannt, die über eine Enzyminduktion sowohl ihrer eigenen Stoffwechsel, als auch den anderer Fremdstoffe oder den körpereigener Verbindungen stimulieren können. Es handelt sich dabei vorwiegend um lipoidlösliche Stoffe. Zu diesen Enzyminduktoren gehören unter anderem Phenylbutazon, Chlorcyclin, Probenecid, Tolbutamid, Hexo-, Pento-, Phenobarbital, Amidopyrin, Meprobamat, Gluthethimid, Chlorpromazin, polycyclische Kohlenwasserstoffe, wie 3-Methylcholanthren (3-MC) und 3,4-Benzpyren (15). Der molekulare Mechanismus über den diese Stoffe eine Enzyminduktion auslösen ist noch nicht geklärt. Von Phenobarbital und vielen polyzyklischen Kohlenwasserstoffen weiß man, daß sie in der Lage sind, die Aktivität verschiedener Komponenten des Genaktionssystems zu verändern. Diese Komponenten umfassen sowohl Transskription im Kern als auch Translation im Zytoplasma. Eingriffe in das Kontrollsystem der Proteinsynthese könnten zu einer erhöhten Produktion mikrosomalen Proteins führen (29).

In der induktiven Wirkung der oben angeführten Substanzen bestehen Unterschiede, die eine Trennung verschiedener hydroxylierender Systeme mit substratspezifischer terminaler Oxygenase Cytochrom P 450 ermöglichten (31). Besonders deutlich sind diese Unterschiede bei Phenobarbital und 3-MC. Ersteres induziert langsam und relativ unspezifisch die Synthese vieler NADPH-abhängiger Enzyme, während 3-MC schnell und selektiv die Synthese nur einiger dieser Enzyme stimuliert (15). Sie induzieren die Bildung verschiedener

Cytochromformen.Nach 3-MC steigt bei Ratten der Gehalt an Cytochrom mit einem Absorptionsmaximum bei 446 nm an, nach Phenobarbital enthalten die Mikrosomen mehr Cytochrom P-450 (31).

III) Mögliche klinische Konsequenzen des veränderten Arzneimittelstoffwechsels

Der durch Enzyminduktion beschleunigte Abbau von Arzneimitteln führt bei einigen Medikamenten zu einer Veränderung von Wirkung und Wirkungsdauer. Im Tierversuch wurde diese von Remmer (59) anhand der verkürzten Evipannarkose bei mit Phenobarbital behandelten Ratten gezeigt. Conney und Mitarbeiter (13) beobachteten nach Vorbehandlung mit Enzyminduktoren bei Ratten abgeschwächte Wirkung und verkürzte Wirkungsdauer des muskelrelaxierend wirkenden Zoxazolamin (2-amino-5-chlorobenzoxazol). Bei unbehandelten Tieren dauerte die Lähmung 730 min., bei denen, die vorher Phenobarbital bekommen hatten, 102 min. und bei den mit 3,4-Benzpyren vorbehandelten 17 min.

Auch bei Menschen werden Einflüsse von Pharmaka auf den Arzneimittelstoffwechsel der Leber beobachtet. Die Elimination von Medikamenten wird jedoch durch soviele Faktoren, wie z.B. Nierenfunktion, Leberdurchblutung, Bindung der Medikamente an Gewebe, an Plasmaeiweiße, beeinflußt, so daß der Anteil einer Hemmung oder Stimulierung des Arzneimittelstoffwechsels nicht bei jedem Medikament von Bedeutung ist.

Klinisch wichtig ist die Kenntnis einer Veränderung der Kapazität des Arzneimittelstoffwechsels, z.B. bei gleichzeitiger Applikation von Anticonvulsiva und Anticoagulantien. Cucinell und Mitarbeiter (18) fanden, daß Phenobarbitalbehandlung den Plasmaspiegel von Bishydroxycumarin (Dicumarol) senkt. Sie beobachteten bei einem Patienten, der mit dem Anticoagulans Bishydroxycumarin behandelt wurde, nach 14-tägiger Verabreichung von Phenobarbital (4 x 30 mg/Tag) einen Abfall im Plasmaspiegel des

Dicumarol von vorher 21 - 45 mg/l auf 9 - 14 mg/l und eine Verkürzung der Prothrombinzeit von 25 - 42 auf 14 - 19 Sekunden (18). Weitere Beispiele sind der beschleunigte Abbau von Diphenylhydantoin, Griseofulvin, Dipyron (Nor-amidopyrin-methansulfonat, Novalgin) und Digitoxin nach Phenobarbitalbehandlung (15) sowie der gesteigerte Abbau des Schmerzmittels Amidopyrin nach Phenylbutazonmedikation (9).

Der Metabolismus körpereigener Substanzen kann ebenfalls durch induzierende Substanzen stimuliert werden. So werden Steroide (Kortisol, Testosteron) nach Behandlung mit Enzyminduktoren schneller hydroxyliert (67). Auch der Stoffwechsel von Bilirubin läuft nach Applikation von Phenobarbital (71), Phetarbital (34) u. a. schneller ab. Daraus ergeben sich unter Umständen therapeutische Möglichkeiten bei Zuständen, die mit einem erhöhten Blutspiegel dieser Substanzen einhergehen, wie z.B. bei dem Cushing-Syndrom (67), bei der nichthämolytischen Hyperbilirubinämie des Neugeborenen (71) oder bei der Hyperbilirubinämie bei Gilbert's Syndrom (34).

IV) Bestimmung der quantitativen Veränderungen der Kapazität des Arzneimittelstoffwechsels

1) "in vitro"

Aus diesen Beispielen ergibt sich, daß es bei der Anwendung eines Medikaments mit häufiger Indikation oder geringer therapeutischer Breite notwendig ist, stimulierende oder hemmende Eigenschaften nachzuweisen. Die Aktivität mikrosomaler Enzyme kann durch "in vitro" Versuche bestimmt werden. Dazu benötigt man ein Homogenat aus Lebergewebe, aus dem durch Zentrifugieren die Mikrosomenfraktion gewonnen wird. Diese wird dann mit Pufferlösung, dem entsprechenden Substrat und den notwendigen Cofaktoren ($NADPH_2$, ATP usw.) inkubiert und die Enzymaktivität aus dem pro Zeiteinheit stattfindenden Substratumsatz bestimmt. Diese "in vitro" Methode der Messung der Enzymaktivität ist auch beim Patienten möglich, wobei hier das Lebergewebe durch eine Leberpunktion gewonnen wird.

Jedoch ist eine Leberpunktion, allein zu diesem Zweck, nicht vertretbar. Weitere Nachteile von "in vitro" Untersuchungen liegen in der Schwierigkeit optimale Cofaktor- und Substratkonzentrationen zu erhalten, um so Voraussagen über den "in vivo" ablaufenden Arzneimittelstoffwechsel treffen zu können. Weiterhin bleibt bei "in vitro" Untersuchungen der extrahepatische Arzneimittelstoffwechsel ebenso unberücksichtigt wie der Anteil nicht enzymatischer Faktoren, wie Leberdurchblutung und Plasmabindung der Medikamente für die Elimination von Pharmaka (64).

2) "in vivo"

Deshalb ist es wünschenswert, in der Klinik "in vivo" Parameter zu messen. Dazu gehören pharmakokinetische Daten von Testsubstanzen (Halbwertszeit, Ausscheidungsgeschwindigkeit), die von mikrosomalen Enzymen abgebaut werden. Weiterhin werden auch die Ausscheidungsmengen von Stoffen gemessen, die als End- oder Nebenprodukt von Reaktionen entstehen, die durch Enzyme des Arzneimittelstoffwechsels katalysiert werden. Als geeignete Testsubstanzen haben sich Antipyretica und Analgetica, wie Antipyrin und Amidopyrin erwiesen (37), deren Ausscheidung fast ausschließlich durch den Abbau in der Leber bestimmt wird. Amidopyrin wird u.a. in den Lebermikrosomen in N-Stellung demethyliert und als Aminoantipyrin bzw. als dessen acetylierte Abkömmlinge über Galle und Urin ausgeschieden (62). Die Messung der Ausscheidungsgeschwindigkeit dieses Medikaments und die Berechnung seiner Halbwertszeit geben einen guten Hinweis auf die Aktivität des abbauenden Monooxygenasesystems. Ein beschleunigter Stoffwechsel von Amidopyrin wurde nach Behandlung mit dem induzierend wirksamen Phenylbutazon beobachtet (9). Als ebenfalls brauchbar für die Messung der Aktivität hydroxylierender Enzyme der Lebermikrosomen, erwies sich die Bestimmung von 6ß-Hydroxycortisol, einem Oxydationsprodukt körpereigenen Cortisol im Urin (40). Um sicherzugehen, daß die Erhöhung der 6ß-Hydroxycortisolausscheidung durch gesteigerte Aktivität der abbauenden 6ß-Hydroxylase und nicht durch vermehrte Produktion von Corticosteroiden durch die Nebennierenrinden verursacht ist, werden die 17-Hydroxysteroide, die

nicht durch dieses Enzym abgebaut werden, im Urin mitbestimmt (40). "In vitro" Untersuchungen an Meerschweinchen ergaben nach Behandlung mit dem Enzyminduktor Phetharbital (N-Phenylbarbital, 100 mg/kg/Tag) eine Zunahme des 6ß-Hydroxylasespiegels der Leber um mehr als 100 % (40). Bei 4 Probanden konnten die gleichen Autoren (40) nach 36tägiger Phetharbitalbehandlung eine signifikante Steigerung der 6ß-Hydroxycortisolausscheidung im Urin erkennen. Diese Befunde sprechen dafür, daß die Ausscheidung von 6ß-Hydroxycortisol im Urin die Aktivität der 6ß-Hydroxylase widerspiegelt.

Auch die Gamma-Glutamyltranspeptidaseaktivität (EC.2.3.2.2) im Serum wurde als "in vivo" Parameter einer Induktion mikrosomaler Enzyme bestimmt (20). Es ist jedoch nicht sicher, ob die Aktivitätssteigerung dieses Enzyms im Serum nach Behandlung mit induzierenden Medikamenten auf vermehrte Neubildung oder auf andere Ursachen, wie z.B. verstärkten Untergang von Leberzellen zurückzuführen ist (10).

Einige Autoren zogen die Zuckersäureausscheidung im Urin als Parameter einer Induktion mikrosomaler Enzyme heran (1, 34, 66 u. a.).

V) Messung der Zuckersäureausscheidung im Urin als "in vivo" Parameter des Arzneimittelstoffwechsels

1) Die Bildung der Zuckersäure im Organismus

Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit der Bestimmung der Zuckersäure im Urin zur Charakterisierung der Kapazität des Arzneimittelstoffwechsels, unter besonderer Berücksichtigung ihrer Anwendung als Parameter einer Induktion mikrosomaler Enzyme durch Untersuchungen von Probanden unter Kontrollbedingungen und nach Phenobarbital bzw. Clemastine (Tavegil^{R})

Marsh (46, 47, 48) befaßte sich in eingehenden Untersuchungen an der Rattenleber mit der Entstehung der Zuckersäure (s. Abb. 1). Dabei fand er als Vorläufer der Zuckersäure das D-Glucuronolac-

ton, das aus freier Glucuronsäure spontan oder enzymatisch entsteht (D-Glucurono-δ-lacton-hydrolase) (34). D-Glucuronsäure kann durch Phosphatabspaltung aus Uridindiphosphatglucuronsäure (UDPGlucuronsäure) gebildet werden, durch enzymatische Hydrolyse aus Glucuroniden freigesetzt oder mit der Nahrung zugeführt werden (47). D-Glucuronolacton wird unter der Katalyse einer NAD-abhängigen D-Glucuronolactondehydrogenase (D-Glucurono-δ-lacton: NAD^+ oxidoreductase EC 1.1.1.70) zu D-Glucurono (1:4) (6:3) dilacton oxydiert. Aarts und Hinnen-Bouwmans fanden jedoch, daß Eigenschaften dieses Enzyms (pH-Optimum, K_m-Wert, Hitzeinaktivierung u.a.) mit denen der Aldehyddehydrogenase (aldehyde: NAD^+ oxidoreductase, EC 1.2.1.3) übereinstimmten und schlossen daraus, daß es sich um ein und dasselbe Enzym handelt und somit eine eigene EC Nummer überflüssig ist (4). Das (1:4) (6:3) dilacton wird zu 30 % zu Saccharo (1:4) lacton und zu 60 % zu Saccharo (6:3) lacton hydrolysiert (41). Diese Lactone gehen teilweise in D-Zuckersäure über, wobei bei physiologischem pH-Wert und Temperatur die Säure weitgehend unverändert vorliegt. Bei saurem pH und hoher Temperatur ist sie zu etwa 50 % in die Lactonformen umgewandelt (41).

Ein weiterer Abbauweg der D-Glucuronsäure führt über die L-Gulonsäure zu L-Xylulose und dann in den Pentosephosphatzyklus. Bei einigen Tierarten kann D-Glucuronsäure über L-Gulonsäure zu L-Ascorbinsäure abgebaut werden.

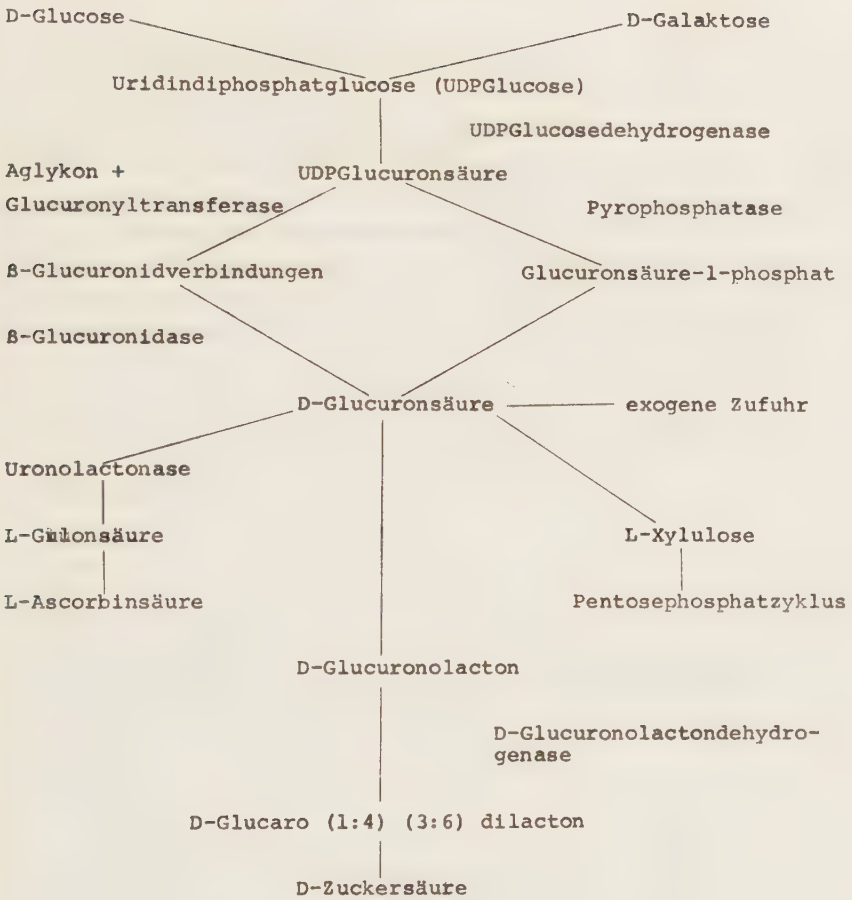

Abb. 1: Entstehung der Zuckersäure im Organismus. Angegeben sind die wichtigsten Enzyme des Glucuronsäurestoffwechsels und seiner Nebenwege (s.a. Text)

2) Korrelation von Zuckersäurebildung und Arzneimittelstoffwechsel der Leber

Die ersten, die eine Verbindung zwischen Arzneimittelstoffwechsel und dem zuletzt beschriebenen Weg des Glucuronsäureabbaus beobachteten, waren 1935 Enklewitz und Lasker (25). Sie entdeckten bei Patienten mit essentieller Pentosurie eine gesteigerte L-Xyluloseausscheidung nach Behandlung mit Antipyrin (Phenazon). Bei der essentiellen Pentosurie handelt es sich um einen Enzymdefekt, bei dem L-Xylulose nicht zu L-Xylit reduziert wird, somit nicht in den Pentosephosphatzyklus übergehen kann und vermehrt im Urin ausgeschieden wird. Die vermehrte Ausscheidung nach Antipyrinbehandlung erklärten die Autoren damit, daß das Medikament nach Konjugation mit Glucuronsäure ausgeschieden wird und deshalb zu seiner Elimination ein erhöhtes Angebot an Glucuronsäure erforderlich ist. Dies wiederum führt zu einer verstärkten Bildung von L-Xylulose (25).

Longenecker, Fricke und King vermuteten einen Zusammenhang zwischen Entgiftungsprozessen in der Leber und der Produktion von Ascorbinsäure, da Albinoratten, die u. a. Beruhigungsmittel und Antipyretica bekamen, erhöhte Ascorbinsäureausscheidung im Urin zeigten (42).

Conney und Mitarbeiter (11) fanden, daß Pharmaka (u. a. Phenobarbital, Barbital), die in der Lage waren, die Ascorbinsäuresynthese bei Ratten zu stimulieren, auch die Aktivität von Enzymen des Arzneimittelstoffwechsels steigerten (11). Sie beschrieben nach intraperitonealer Applikation der genannten Pharmaka erhöhte Aktivität der Enzyme, die 3,4 Benzpyren und Zoxazolamin hydroxylieren und die Azobindung von Aminoazofarbstoffen reduzieren (11).

Eine Beziehung zwischen dem Stoffwechsel von Pharmaka und der Ausscheidung von Zuckersäure im Urin stellten Marsh und Reid (49) her. Sie entdeckten, daß bei Ratten und Meerschweinchen die Behandlung mit Barbital, Chlorbutanol, oder 3-Methylcholanthren

neben der Ascorbinsäureausscheidung auch die der Zuckersäure steigerte und führten dies, da sie keine Aktivitätssteigerung des Enzyms Glucuronolactondehydrogenase fanden, auf ein erhöhtes Angebot von freier D-Glucuronsäure zurück (49).

Wichtige Anhaltspunkte für die Anwendung der Zuckersäureausscheidung im Urin als Parameter für eine Induktion arzneimitteloxydierender Enzyme in der Leber lieferten die Tierversuche von Aarts (1). Er applizierte Meerschweinchen 3 Tage lang 2 mal täglich 16 mg Natriumbarbital in 4 ml physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal. Gemessen wurde dabei die Ausscheidung von Zuckersäure im Urin und nach Tötung der Tiere die Demethylierungsgeschwindigkeit der Enzyme der Lebermikrosomen. Aarts beobachtete eine gesteigerte Ausscheidung und eine erhöhte Geschwindigkeit der Demethylierung.

Hunter und Mitarbeiter (36) beschrieben bei Meerschweinchen nach 5 tägiger Behandlung mit Phenobarbital (50 mg/kg Körpergewicht) eine signifikante Korrelation zwischen dem Lebergehalt an Cytochrom P 450 und der täglichen Ausscheidung von Zuckersäure im Urin. Nach Verabreichung des Proteinsynthesehemmstoffes Actinomycin D kam es zu einem synchronen Abfall des Lebergehalts an Cytochrom P 450 und der Zuckersäureausscheidung. Zwischen beiden Größen bestand auch jetzt eine signifikante Korrelation (36).

Die Korrelation zwischen Cytochrom P 450-Gehalt der Lebermikrosomen und der Zuckersäureausscheidung im Urin läßt einen kausalen Zusammenhang zwischen hydroxylierenden, mikrosomalen Enzymen und Enzymen, die in den Glucuronsäureabbau einbezogen sind, vermuten. Allerdings sind in letzteren sowohl mikrosomale als auch nicht mikrosomale eingeschlossen, wobei weder die entscheidende Verbindung zwischen beiden Enzymsystemen noch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Glucuronsäureabbaus bekannt ist (36).

Notten und Henderson (53) beobachteten nach 8tägiger Behandlung von Meerschweinchen mit Disulfiram (Antabus, Tetraäthylthiuramdisulfid)eine gesteigerte Aktivität N-demethylierender Enzyme, eine Zunahme der Glucuronidierung von p-Nitrophenol,begleitet von einer vermehrten Ausscheidung von Zuckersäure im Urin.

Je nach Tierspezies und induzierenden Pharmakon finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben über die, für eine erhöhte Zucker- bzw. Ascorbinsäureausscheidung verantwortlichen Enzyme. Hollman und Touster (33) stellten eine Erhöhung der UDP-glucose: NAD-oxidoreductase nach Chlorbutanol und Barbitalbehandlung bei Ratten fest. Auch Conney und Mitarbeiter (13) fanden bei Ratten nach Chlorbutanolbehandlung die UDPG-dehydrogenaseaktivität um 100 % erhöht. Aarts dagegen konnte nach Barbitalbehandlung bei Ratten und Meerschweinchen zwar erhöhte Zukkersäureausscheidung (Ascorbinsäure bei Ratten) im Urin und gesteigerte Demethylierungsaktivität beobachten, fand aber keine signifikante Änderung der UDPGdehydrogenase gegenüber den Kontrolltieren (2). Marselos und Hänninen (45) beschrieben bei Ratten nach Phenobarbitalbehandlung und Cinchophen eine Zunahme der Glucuronolactondehydrogenaseaktivität und der Zuckersäureausscheidung im Urin. Beide Effekte konnten mit dem Proteinsynthesehemmstoff Actinomycin D verhindert werden. Marsh (49) dagegen stellte nach Barbital und 3-MCgaben bei Ratten keine Veränderung der Aktivität dieses Enzyms fest. Auch eine Steigerung der D-glucurono-δ-lactonhydrolase nach Phenobarbitalbehandlung wurde bei Tieren beschrieben (Kawada, zitiert nach (34)).

Ein weiterer Weg zur Steigerung der Ascorbin- bzw. Zuckersäureausscheidung führt möglicherweise über eine verstärkte kombinierte Aktion von Glucuronyltransferase und ß-Glucuronidase (55). Hollman und Touster (33) beobachteten bei Ratten nach Amidopyrin- und 3,4 Benzpyrenapplikation eine erhöhte Aktivität der UDPGlucuronyltransferase (33). Dadurch könnte es zu einem verstärkten Anfall von Glucuronidverbindungen kommen. Diese können über vermehrte spontane oder enzymatische Hydrolyse zu einem erhöhten Angebot freier D-Glucuronsäure und damit zu erhöhter Zucker- bzw. Ascorbinsäureausscheidung führen.

Die enzymatische Hydrolyse wird durch das Enzym ß-Glucuronidase (ß-D-glucuronid glucuronohydrolase, EC 3.2.1.31) katalysiert, das sowohl in den Lysosomen als auch in der Mikrosomenfraktion der Leber vorhanden ist (27). Neben der Hydrolyse soll das Enzym auch bei der Konjugation mit Glucuronsäure beteiligt sein, indem es die Säure von einem Donor auf geeignete Akzeptoren, Alkohole, Glykole u.a. überträgt (27). Eine Erhöhung der hydrolytischen Aktivität der ß-Glucuronidase im Serum wird u.a. bei Patienten während Eingriffen am offenen Herzen und bei Personen mit Brustkrebs, die sich einer Hypophysektomie unterziehen, beobachtet (27). Auch bei epileptischen Patienten unter Anticonvulsivatherapie fanden japanische Autoren (54) eine gesteigerte Aktivität des Enzyms im Serum. Für eine Beteiligung der ß-Glucuronidase bei der Zuckersäurebildung spricht, daß diese Patienten beträchtlich erhöhte Serumspiegel dieser Säure aufwiesen (54).

Die Aussagekraft eines erhöhten Zuckersäurespiegels für die Beurteilung des Arzneimittelstoffwechsels wird durch Aarts (2,3) insoweit eingeschränkt, als seiner Meinung nach eine erhöhte Zuckersäureausscheidung zwar Folge eines medikamentösen Einflusses auf die Leberfunktion, aber nicht unbedingt die Folge einer Induktion mikrosomaler Enzyme ist. Bei Hunden fand er u. a., daß die Zuckersäureausscheidung nach Verabreichung von Thiopental und Barbital bereits nach zwei Stunden anzusteigen begann, einer für eine Enzyminduktion zu kurzen Zeit. Weiterhin wurde durch Applikation von Proteinsynthesehemmstoffen die Steigerung der Zuckersäureausscheidung nach Barbital nicht verhindert. Nach Behandlung mit Chlorambutol schieden Ratten beträchtlich mehr Zuckersäure aus, ohne daß sich ein Anstieg der UDPGdehydrogenase erkennen ließ (3). Das ist jedoch nur entscheidend, wenn dies der limitierende Schritt für eine Erhöhung der Zuckersäureausscheidung ist.

Obwohl daraus zu erkennen ist, daß nicht alle Faktoren, die zu erhöhter Zuckersäureausscheidung führen, bekannt sind, spricht doch die Mehrzahl der aufgeführten Ergebnisse aus Tierversuchen für einen Zusammenhang zwischen der Aktivität hydroxylierender und in den Glucuronsäureabbau einbezogenen Enzyme. Wenn auch diese Ergebnisse noch nicht ohne weiteres auf den Menschen zu übertragen sind,

sollte doch die Höhe der Zuckersäureausscheidung im Urin als "in vivo" Parameter einer Induktion fremdstoffabbauender Enzyme der Leber diskutiert werden.

3) Methoden der Zuckersäurebestimmung

Die Zuckersäureausscheidung im Urin kann enzymatisch, chemisch und gaschromatographisch bestimmt werden.

Marsh (46) beschrieb eine enzymatische Methode, die auf der spezifischen Hemmung der ß-Glucuronidase durch das Saccharo (1:4) lacton beruht (s. S 28). Die von Ishidate (38) ausgearbeitete chemische Bestimmungsmethode basiert auf einer Abtrennung der Zuckersäure aus dem Urin mit Ionenaustauschchromatographie und nachfolgender quantitativer, colorimetrischer Bestimmung (s.S.31).

Zur gaschromatographischen Bestimmung muß der Urin zunächst gereinigt werden und die Zuckersäure in eine für die Gaschromatographie geeignete Form übergeführt werden. Matsunaga et al. (50) trennten störende neutrale, basische und aromatische Verbindungen mit Ionenaustauschchromatographie ab. Gangolli und Mitarbeiter (28) isolierten die Zuckersäure und ihre Lactone aus dem Urin, indem sie ihn zwei Stunden lang in 0,1 M Salzsäure kochten. Nach dieser Zeit ist ein Gleichgewichtszustand zwischen Säure und Lactonformen erreicht. Es liegen dann 47 % der Säure als 1:4 und 6:3 lacton vor. Für die gaschromatographische Bestimmung geeignet erwiesen sich die Trimethylsilylderivate der Aldonformen der Uron- und der Dicarboxylsäuren (50) bzw. der Trimethylsilyläther des Methylesters des Glucaro 1:4 lactons (28).

VI)Problemstellung

In dieser Arbeit soll
1) die enzymatische Bestimmungsmethode der Zuckersäure für die routinemäßige Anwendbarkeit überprüft bzw. modifiziert werden und
2) im Rahmen zweier Versuchsreihen die Zuckersäureausscheidung im Urin als "in vivo" Parameter des Arzneimittelstoffwechsels bei

Probanden unter Kontrollbedingungen nach Clemastine und Phenobarbital untersucht werden. Dabei wird gleichzeitig die Aktivität der ß-Glucuronidase im Serum als möglicher Faktor einer Erhöhung der Zuckersäureausscheidung gemessen.

B) MATERIAL

I) Material für die enzymatische Bestimmung der Zuckersäure

1) Reagenzien

Als Enzym wurde ß-Glucuronidase von helix pomatia (ß-D-Glucuronid glucuronohydrolase, EC 3.2.1.31, Boehringer, Mannheim) verwendet. Als Substrat diente p-Nitrophenylglucuronid (p-Nitrophenyl-ß-D-glucuronid Molekulargewicht (MG) 315.2 reinst Firma Serva, Heidelberg)
0.1 M Acetatpuffer, pH 4.5 (6)
0.5 N Natronlauge.
Vergleichende Untersuchungen wurden mit Phenolphthaleinglucuronid (p- [3 (p-Hydroxyphenyl)-Phthalidyl-phenyl] ß-D-glucosiduronsäure, MG 494.4 Firma E. Merck AG, Darmstadt) durchgeführt. Dazu wurden weiterhin benötigt
1 N Natronlauge
0.4 M Glycinpuffer, pH 10.45 (6)
Als Standardsubstanz für die Hemmung der ß-Glucuronidase wurde Ca-D-Saccharat, MG 320.27, (E. Merck AG, Darmstadt) herangezogen.

2) Geräte

pH Messungen und Einstellungen erfolgten an einem pH-Meter (Firma Knick, Berlin,-Zehlendorf)

Eppendorfmikropipetten (für ß-Glucuronidase, p-Nitrophenylglucuronid, Ca-D-Saccharat und Urin)

Oxfordpipettoren

Die Analysenansätze wurden in einem Wasserbad (Firma Braun, Melsungen) inkubiert.

Die Extinktionsmessungen erfolgten in Glasküvetten (10 mm, Normalglas) an einem Spectralphotometer (Zeiss, Typ PMQ II) mit Küvettentransportautomatik.

Die Berechnung der Zuckersäureausscheidung geschah mit Hilfe eines Tischcomputers (Typ Programma 101, Firma Olivetti). Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde am "Advanced Programming Calculator 720 C" (Firma Wang) durchgeführt.

II) Material für die chemische Zuckersäurebestimmung

1) Reagenzien

a) für die Ionenaustauschchromatographie
Als Ionenaustauschharz wurde Dowex 1 x - 8,100 - 200 mesh (Serva, Heidelberg) verwendet.
Di-Natriumtetraborat, z.A., MG 201.22, (E. Merck AG, Darmstadt)
Natriumsulfat, wasserfrei, z.A., MG 142.04, (E. Merck AG, Darmstadt)

Damit wurden hergestellt:
Natriumborat, 0.1 M, wäßrige Lösung (w. L.)
Natriumborat (0.05 M)-Natriumsulfat (0.02 M), w. L.
Natriumborat (0.05 M)-Natriumsulfat (0.1 M), w. L.

b) für die quantitative colorimetrische Bestimmung wurden folgende Lösungen hergestellt:
Kaliumdihydrogenphosphat 1.0 M, w.L.
Perjodsäure, 0.01 M, w.L. z.A. MG 227.94, (E. Merck AG, Darmstadt)
Phenylhydrazinhydrochlorid 1 % w.L., z.A., MG 144.61 (E. Merck AG, Darmstadt)
Konzentrierte Salzsäure
Kaliumhexacyanoferrat (III) 5 % w.L., z.A., MG 329.26 (E.Merck AG, Darmstadt)
Für die Eichreihe wurde Zuckersäuremonokaliumsalz, reinst, MG 248.2, (Firma Carl Roth OHG, Karlsruhe) verwendet.

2) Geräte

Für die Ionenaustauschchromatographie wurden Glassäulen nach den von Ishidate (38) angegebenen Maßen (Länge 13 cm, Durchmesser 1 cm) in der Glasbläserwerkstatt des Klinikums Steglitz angefertigt.

Für die quantitative colorimetrische Bestimmung wurden 25-ml Reagenzgläser mit Glasstopfen benötigt. Die übrigen Geräte entsprachen den in I, 2 angegebenen.

III) Material für die ß-Glucuronidasebestimmung im Serum (68)

Als Substrat für die ß-Glucuronidase diente eine 50 mM Lösung von p-Nitrophenylglucuronid (MG 315.2, Serva, Heidelberg). Als Standard wurde p-Nitrophenol, Indikator, MG 139.11, (E. Merck AG, Darmstadt) verwendet. Eine 3 mM Stammlösung wurde durch Lösen von 41.76 mg in 100 ml 0.02 N Natronlauge hergestellt. Die Gebrauchslösung war 0,3 mM. Als Puffer diente 0.2 M Essigsäureacetat, pH 4.0 nach Walpole (58). Mit 0.15 N Natronlauge wurde die Reaktion gestoppt.

IV) Gewinnung des Untersuchungsmaterials - Durchführung der Probandenversuche

Die Prüfung der Zuckersäureausscheidung im Urin als "in vivo" Parameter des Arzneimittelstoffwechsels erfolgte im Rahmen zweier Versuchsreihen, bei denen auch andere "in vivo" Parameter, wie Amidopyrinhalbwertszeit, 6-ß-Hydroxycortisolausscheidung im Urin, Gamma-Glutamyltranspeptidaseaktivität im Serum hinsichtlich ihrer routinemäßigen Anwendbarkeit überprüft wurden (32, 63).

1) Versuchsreihe I

An der Versuchsreihe I, die als Doppelblindstudie in einem Berliner Hotel durchgeführt wurde, beteiligten sich 19 Freiwillige (männlich, 20 - 32 Jahre, 18 Kaukasier, 1 Afrikaner). Bei die-

sen Probanden wurden alle oben aufgeführten "in vivo" Parameter überprüft.
Jeder Proband wurde über die Untersuchungen unterrichtet und unterschrieb eine Einverständniserklärung. Die Freiwilligen standen 7 Wochen unter Beobachtung. In diesen Zeitraum fiel eine Woche der Eingewöhnung ohne Medikation, zwei Wochen dauerte die Medikationsperiode und über 4 Wochen nach diesem Abschnitt wurden die Probanden zusätzlich ärztlich überwacht. Der Aufenthalt im Hotel dauerte vom 5. Tag der 1. Woche bis zum 5. Tag der 4. Woche. Bei jedem Probanden wurde eine vollständige Anamnese erhoben. Vor und nach Beendigung des Versuchs sowie am Ende der ersten und dritten Woche wurde eine gründliche medizinische Untersuchung durchgeführt. Vor Versuchsbeginn, nach Abschluß der Medikation und am Ende der 7. Woche wurden die Laborwerte der Probanden bestimmt. Weiterhin wurde zu Beginn der Untersuchungen ein Narkotikasuchtest durchgeführt.

Während der 2. und 3. Woche erhielten 6 Probanden Placebo, 6 Clemastine, Tavegil^{R} (HS 592, Tavist, 1-methyl-[2-2-(a-methyl-p-chlordiphenyl-methyloxy)ethyl] pyrrolidin-hydrogen fumarat) und 7 Probanden Phenobarbital. Die Verabreichung der Pharmaka erfolgte im Rahmen einer Doppelblindstudie so, daß jeder Proband 2 Fläschchen bekam, von denen eines die wirksamen Medikamente, das andere, diesen völlig gleiche Placebos enthielt. Unter Aufsicht eines Arztes mußten die Probanden jeden Tag um 8, 14 und 20 Uhr, 14 Tage lang zwei Tabletten aus jeder Flasche einnehmen. Die Teilnehmer der Versuchsreihe konnten nach den Medikamenten, die sie einnahmen, in drei Gruppen eingeteilt werden:

	Flasche 1	Flasche 2
Placebogruppe:	Placeboform der Phenobarbitaltabletten	Placeboform der Clemastinetabletten
Phenobarbitalgruppe :	wirksame Phenobarbitaltabletten	Placeboform der Clemastinetabletten
Clemastinegruppe :	Placeboform der Phenobarbitaltabletten	wirksame Clemastinetabletten

Die Dosierung von Phenobarbital war 300 mg/Tag (Tablette à 50 mg), die des Clemastine 6 mg/Tag (Tablette à 1 mg).

Der 24-Stundenurin wurde an folgenden Tagen gesammelt:

1. Woche:	4., 5., 6. Tag	≙	14., 15., 16. Oktober
2. Woche:	2., 4., 6. Tag	≙	19., 21., 23. "
3. Woche:	3., 7. Tag	≙	27., 31. "
4. Woche:	1., 3. Tag	≙	1., 3. November

Der von 8 Uhr des Sammeltages an bis 8 Uhr des darauffolgenden Tages gesammelte Urin wurde mit Toluol versetzt und bis zum Ende derSammelperiode kühl gelagert. Dann wurde das gesamte Tagesvolumen bestimmt, gemischt, mehrere Teilmengen abgezweigt und bei -20°C gelagert. Das Urinsammeln wurde sorgfältig überwacht.

Am 3. Kontrolltag wurde den Probanden eine Testdosis von 600 mg Amidopyrin verabreicht und fünfmal innerhalb von 7 Stunden Blut entnommen. Der Urin dieses Tages wurde in Portionen gesammelt, so daß die Ausscheidung der Abbauprodukte,4- Aminoantipyrin und Acetyl-4-aminoantipyrin, 6, 12 und 24 Stunden nach Medikation bestimmt werden konnte. Dieser Amidopyrintest wurde am 3. Tag der 4. Woche wiederholt, um Werte aus der Zeit nach der Phenobarbitalbehandlung zu erhalten. Im Urin wurde weiterhin die Ausscheidung von 6 ß-Hydroxycortisol und 17-Hydroxycortisol bestimmt. Zusätzlich wurde vor und nach der Behandlung die ß-Glucuronidaseaktivität und die Gamma-Glutamyltranspeptidaseaktivität im Serum gemessen (32, 63).

2) Versuchsreihe II

Für die Versuchsreihe II stellten sich 5 männliche Probanden freiwillig zur Verfügung. Sie wurden für 9 Tage im Klinikum Steglitz stationär aufgenommen. Als induzierende Substanz wurde ihnen über 5 Tage Phenobarbital (Luminal) in der Dosierung 500 mg/Tag gegeben. An allen 9 Versuchstagen wurde der 24-Stundenurin gesammelt, die Gesamtmenge gemessen, ein Aliquot abgefüllt und bei -20°C eingefroren. Den Urinproben wurde vor dem Einfrieren soviel Toluol zugegeben, daß die Oberfläche abgedeckt war.

Der erste Aufenthaltstag im Klinikum diente den Probanden zur Eingewöhnung. Am 2. Tag wurde ein Amidopyrintest durchgeführt. Dazu wurde den Probanden 1.2 g Amidopyrin verabreicht und in Stundenabstand 6 mal Blut abgenommen. Die Serumproben wurden ebenfalls bei -20°C gelagert. Vom 3. bis zum 7. Tag dauerte die Behandlung mit Phenobarbital. Am 8. Tag, nach Absetzen des Phenobarbitals, wurde erneut ein Amidopyrintest durchgeführt, am 9. Tag nur Urin gesammelt. Aus den Serumproben wurde die Amidopyrinkonzentration gaschromatographisch bestimmt und die pharmakokinetischen Daten, wie Halbwertszeit, Eliminationskonstante, "total body clearance" berechnet (63).

C) METHODIK

I) Die enzymatische Methode der Zuckersäurebestimmung nach Marsh (46)

1) Prinzip

Levy (28) hatte erkannt, daß bei saurem pH, beschleunigt durch Kochen, eine Zuckersäurelösung (I) zu 30% in das Saccharo-(1:4)-lacton (II), den spezifischen, kompetitiven Hemmstoff des Enzyms ß-Glucuronidase übergeht. Zu etwa 20% entsteht Saccharo-(6:3)-lacton (III) und zu einem geringen Prozentsatz das (1:4)(6:3) dilacton (IV)(41), die ebenso wie die freie Zuckersäure die ß-Glucuronidase nicht hemmen.
Im Urin war ebenfalls ein, die ß-Glucuronidase hemmender Faktor beobachtet worden.

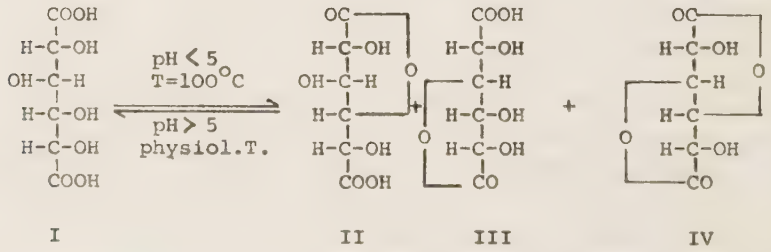

Abb. 2: Gleichgewichtsreaktion von Zuckersäure (I) und ihren Lactonformen (II, III, IV) in Abhängigkeit von pH und Temperatur (T) s.a. Text.

Marsh vermutete, daß die säurepotenzierte Hemmung der ß-Glucuronidase durch Urin ebenfalls durch Zuckersäure hervorgerufen wurde. Um dieses zu beweisen, isolierte er die Zuckersäure aus Urin und identifizierte sie als Bisphenylhydrazinverbindung und durch papierchromatographische Untersuchungen (46).

Die von Marsh (46) entwickelte, enzymatische Methode der Zuckersäurebestimmung basiert auf der hemmenden Wirkung des Lactons und geschieht nach folgendem Prinzip:

Das Enzym ß-Glucuronidase katalysiert die Hydrolyse von ß-d-Glucuronidverbindungen (24):

$$\text{R-GLUCURONID} \xrightarrow{\text{ß-Glucuronidase}+H_2O} \text{ROH + GLUCURONSÄURE}$$

R = Aglykon, z.B. Phenolphthalein

Als Maß für die Enzymaktivität benützt man die pro Zeiteinheit freigesetzte Menge des Aglykons. Um diese bestimmen zu können, nimmt man als Substrat für die ß-Glucuronidase z.B. Glucuronidverbindungen von Farbstoffen, wie Phenolphthalein oder p-Nitrophenol, die jedoch erst in freier Form oder in alkalischem Milieu farbig sind. Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von Lauge (die Hydrolyse spielt sich nur in saurem Milieu ab), kann aus der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge durch den freigesetzten Farbstoff dessen Menge berechnet werden. Wird ein Hemmstoff des Enzyms, z.B. Saccharo (1:4) lacton, dem Ansatz zugegeben, setzt das Enzym entsprechend weniger Farbstoff frei. Die Extinktion ist geringer. Anhand einer Eichkurve mit verschiedenen Konzentrationen Saccharo (1:4) lacton kann die Menge dieses Hemmstoffs in einer Lösung, z.B. Urin ermittelt werden.

2) Die Durchführung der Zuckersäurebestimmung nach Marsh (46)

Marsh benützte als Substrat für die ß-Glucuronidase Phenolphthalein-ß-D-glucuronid. Die Enzymlösung bereitete er selbst aus Lebern von "Lister strain rats". Um sicherzugehen, daß die ge-

samte, im Urin vorhandene Zuckersäure in der Lactonform vorlag, unterzog er die Urinproben vor Zugabe zum Ansatz folgender Behandlung:

Ein Teil des Urins wurde mit 3 N Salzsäure auf einen pH-Wert von 2.0 - 2.2 gebracht, 40 Minuten bei 100°C gekocht und danach mit 1.0 N Natronlauge auf pH 4.0 - 4.5 eingestellt. Der andere Teil wurde mit Natronlauge auf einen pH von 7.5 - 8.0 gebracht, 15 min. gekocht und anschließend der pH Wert mit 3 N Salzsäure auf 6.0 - 6.5 korrigiert. Mit diesem Vorgehen wurden die pH-unabhängigen, ß-glucuronidasehemmenden Faktoren im Urin erfaßt. Durch das Kochen bei saurem bzw. alkalischem pH wurden die Urinproben frei von jeder eigenen ß-Glucuronidaseaktivität. Die Korrektur des pH nach dem Kochen war notwendig, um Störungen des Versuchs-pH (5.2) zu vermeiden. Der so behandelte Urin wurde in unterschiedlichen Konzentrationen dem Ansatz zur Testung der ß-Glucuronidaseaktivität hinzugegeben. Dieser enthielt weiterhin in einem Volumen von 4 ml, 0.63 mM Phenolphthaleinglucuronidlösung, 0,5 ml Enzymlösung (in der Aktivität, die in diesem Ansatz ohne Hemmstoff 35 - 40 µg Phenolphthalein freisetzt) und 0.125 mM Acetatpuffer, pH 5.2. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Aus den Versuchen ergab sich mit ansteigenden Konzentrationen sauer vorbehandelten Urins eine Zunahme der Hemmung der ß-Glucuronidaseaktivität. Auch die Hemmung durch alkalisch vorbehandelten Urin stieg mit der Urinkonzentration an, blieb aber wesentlich geringer als die des sauer vorbehandelten. Der Unterschied in der Hemmkraft zwischen beiden Urinen war durch den Übergang der Zuckersäure in das hemmend wirksame Lacton bedingt.

Um die Menge dieses pH-abhängigen Hemmstoffs ohne die aufwendige Prozedur des Isolierens bestimmen zu können, subtrahierte Marsh die Hemmkraft des alkalisch vorbehandelten Urins von der des sauer vorbehandelten bei gleicher Konzentration. Die Hemmkraft wurde dabei in "units of inhibitor" (UI) ausgedrückt, wobei eine "UI" der Hemmstoffmenge entsprach, die im Standardansatz bei pH 5.2

mit 0.63 mM Phenolphtaleinglucuronid als Substrat, die Aktivität der ß-Glucuronidase (s. o.) um 50 % hemmte. Diese Subtraktion der Hemmeinheitenist nach Marsh dann gerechtfertigt, wenn die hemmenden Faktoren im alkalischen Urin pH-unabhängig, die nach Behandlung mit Säure wirksamen, nach alkalischer Vorbehandlung unwirksam sind und die Hemmung durch den pH-abhängigen Hemmstoff und die und die ph-unabhängigen Faktoren sich additiv verhalten. Diese Voraussetzungen trafen für den pH-abhängigen Hemmstoff im Urin, das Saccharo-(1:4)-lacton, wie Marsh in Versuchen nachwies, zu. Die Unabhängigkeit der hemmenden Faktoren im alkalischen Urin vom pH zeigte sich nach Extraktion dieser Faktoren mit Äthylacetat. Sie entwickelten sowohl nach Vorbehandlung mit Säure wie mit Lauge gleiche Hemmkraft. Die Reversibilität der Hemmung durch pH-abhängigen Hemmstoff war erreichbar nach sukzessiver Behandlung einer Urinprobe mit Säure und Lauge (46).

II) Methode der chemischen Zuckersäurebestimmung

Um die routinemäßige Anwendbarkeit der chemischen Zuckersäurebestimmung zu überprüfen, wurden einige Versuche mit dieser Methode durchgeführt.

1) Prinzip

Ishidate und Mitarbeiter (38) beschrieben 1964 eine chemische Methode der Zuckersäurebestimmung im Urin, deren Prinzip in einer Abtrennung der Zuckersäure aus dem Urin durch Ionenaustauschchromatographie und nachfolgender, quantitativer colorimetrischer Bestimmung besteht:

a) Abtrennung der Zuckersäure von anderen Säuren im Urin

Zucker reagieren leicht mit Borat und bilden negativ geladene Komplexe. Bei Passage über ein basisches Harz werden die verschiedenen Zucker in unterschiedlichem Maße von den Ionen des Harzes zurückgehalten (39). D-Zuckersäure wird mit 0.05 M Natriumtetraborat-0.1 M Natriumsulfatlösung aus dieser Ionenbindung befreit.

b) Quantitative Bestimmung

Für die quantitative colorimetrische Bestimmung wird D-Zuckersäure (I) zunächst unter neutralen Bedingungen, bei pH 6.8, durch Perjodsäure oxydiert. Dabei entstehen pro Molekül Zuckersäure zwei Moleküle Ameisensäure und zwei Moleküle Glyoxylsäure (III), wobei letztere oxydativ an Phenylhydrazin (IV) als Azoverbindung (V) gekoppelt werden. Die Reaktion benötigt Phenylhydrazin im Überschuß; es wird CO_2 freigesetzt (s. Abb. 3) (38).

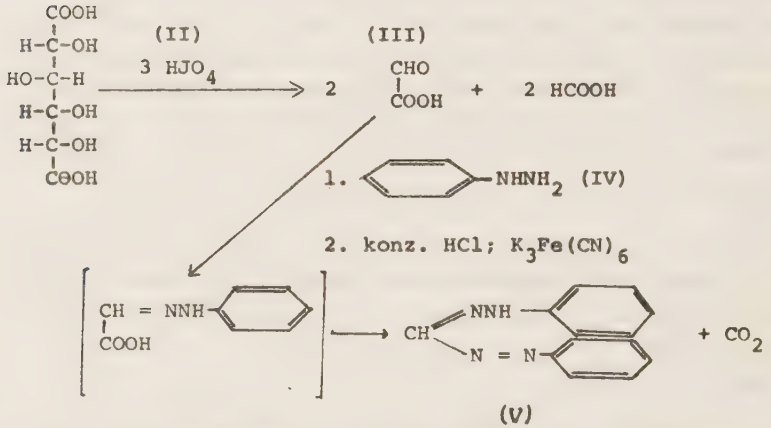

Abb. 3: Reaktionsschema der quantitativen colorimetrischen Bestimmung. Erklärung siehe im Text (aus Ishidate (38).

2) Methodik

Die Ionenaustauschchromatographie wurde mit Dowex 1 x 8, 200 - 100 mesh (Serva) durchgeführt. Das Harz mußte 24 Stunden in aqua bidest quellen, dann wurden drei Milliliter davon auf die Säule (s. Mat.) übertragen. In den Säulen wurde das Harz zunächst mit 18 ml 2 N Salzsäure (= 6fachem Volumen des Harzes) und dem

gleichen Volumen aqua bidest gewaschen. Mit 0.1 M Natriumboratlösung wurde es in die Boratform übergeführt; diese war erreicht, wenn der Test für Chloridionen (mit Silbernitrat) negativ ausfiel (38).

Zur Bestimmung der D-Zuckersäureausscheidung im Urin beim Menschen empfahl Ishidate (38) die Verwendung von 1/600 - 1/800 eines Tagesvolumens Urin (etwa 2 - 4 ml). Diese Menge wurde mit dem gleichen Volumen an 0.1 M Natriumboratlösung versetzt und 15 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Durch das alkalische Milieu der Natriumboratlösung werden die Lactonformen der Zukkersäure durch Ringöffnung in die Säureform übergeführt (38). Weiterhin kommt es zur Bildung der Zucker-Boratkomplexe (39). Danach wurde die Mischung auf das vorbereitete Harz der Säulen gegeben, das sie mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 1 ml/min. passierte. Anschließend ließ man 150 ml 0.05 M Natriumborat-0.02 M Natriumsulfatlösung über das Harz laufen. Die D-Zuckersäure wurde dann mit 20 ml 0.05 M Natriumborat-0.1 M Natriumsulfat aus der Säule gewaschen (38).

5 ml dieses Eluats wurden in ein 25 ml-Reagenzglas mit Glasstopfen gegeben, 1.0 ml 1.0 M Kaliumhydrogenphosphat, wäßrige Lösung, hinzugefügt und kräftig geschüttelt. Anschließend wurden 0.1 ml 0.01 M Perjodsäure zupipettiert, geschüttelt und die Mischung 15 min. lang bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurden 1.0 ml Phenylhydraziniumchlorid einpipettiert (1 %, wäßrige Lösung), wiederum geschüttelt und 10 min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 4 ml konz. HCl zugegeben, sofort danach 1.0 ml Kaliumhexacyanoferrat (5 % ig, wäßrige Lösung) und das ganze kräftig gemischt. 5 - 10 Minuten später wurde die Extinktion der Azoverbindung bei 520 nm am Spektralphotometer Zeiss PMQ II gegen einen Leerwert gemessen, der aus den Testreagenzien und 5 ml des eluierenden Agens bestand. Für die Eichreihe wurden zwischen ein und zwei mg Kaliumhydrogensaccharat in 100 ml 0.05 M Natriumborat-0.1 M Natriumsulfatlösung aufgelöst. Davon wurden 0.5,1, 1.5, 2 und 3 ml mit der gleichen Lösung ad 5 ml aufgefüllt und zur colorimetrischen Bestimmung herangezogen (38).

III) Die Bestimmung von ß-Glucuronidase im Serum nach Szasz (68)

Während der Versuchsreihe I wurde nach der von Szasz beschriebenen Methode die ß-Glucuronidaseaktivität im Serum der Probanden vor und nach der Medikationsperiode bestimmt. (siehe auch Material, S. 25)

Zur Bestimmung wurden in Reagenzgläser pipettiert:

	Analyse	Analysen-leerwert	Reagenzien-leerwert	Standard (0.3 mM)	Wasser-leerwert
Serum (ml)	0.1	0.1	-	-	-
Standard (ml)	-	-	-	0.1	-
Puffer (ml)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Aq.bidest (ml)	-	0.1	0.1	0.1	0.2
Substrat (ml)	0.1	-	0.1	-	-

Tab. 1: Ansätze zur Bestimmung der ß-Glucuronidaseaktivität im Serum (68). Die Konzentration des Standards (p-Nitrophenol) im Ansatz ist 0.03 mM, die des Substrats (p-Nitrophenylglucuronid) 5 mM.

Die Ansätze wurden 5 Std. bei 25°C im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 1.0 ml 15 N Natronlauge zu allen Ansätzen wurde die Reaktion gestoppt. Nach 30 min. wurden die Extinktionen der Ansätze bei 405 nm in 10 mm Normalküvetten gegen den Wasserleerwert gemessen.

Die Berechnung der Aktivität pro ml Serum geschah mit Hilfe des Standards und wurde in milli units (mU/ml) angegeben (68):

$$\text{Aktivität (mU/ml)} = \frac{E(A) - [E(AL) + E(RL)]}{E(St)} \cdot C(St) \cdot \frac{1}{t} \cdot 10^6$$

A = Analyse
AL = Analysenleerwert
RL = Reagenzienleerwert
St = Standard
C(St) = Konzentration des Standards (0.3 mM)
t = Inkubationszeit (300 min.)
E = Extinktionen

Die Aktivität kann auch mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten für unverdünntes p-Nitrophenol (E = 18.5 $cm^2/\mu mol$) berechnet werden (s. S. 38).

IV) Statistische Auswertung

Für alle Probanden wurde nach der auf S. 62 beschriebenen Methode die pro Sammeltag ausgeschiedene Menge Zuckersäure in "μmol/Tag" bestimmt. Je nachdem, welches Medikament die Probanden bekommen hatten, konnten sie in vier Gruppen eingeteilt werden:

Versuch I: Placebogruppe (6 Probanden)
Clemastinegruppe (6)
1. Phenobarbitalgruppe (7)

Versuch II: 2. Phenobarbitalgruppe (5)

Aus den, von den Probanden pro Tag ausgeschiedenen Zuckersäuremengen wurden die Mittelwerte für jeden Tag, an dem Urin gesammelt wurde, berechnet. Zur leichteren statistischen Auswertung wurden die Sammeltage zu Gruppen zusammengeschlossen und aus den pro Tag ausgeschiedenen Mengen Zuckersäure der Probanden die Mittelwerte der Tagegruppen gebildet. Bei dem als Doppelblindstudie durchgeführten Versuch I umfaßte

die Tagegruppe a) die Kontrolltage 1, 2, 3
b) die Tage 6, 8 (2. und 4. Tag der Medikationsperiode)
c) die Tage 10, 14, 18 (6., 10., 14. Tag der Medikationsperiode)
d) die Tage 19, 21 (1. und 3. Tag nach Abschluß der Medikationsperiode)
e) die Tage 10, 14, 18, 19, 21 (32)

Um eine Änderung der Zuckersäureausscheidung deutlich zu machen, wurde die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Werten der Tage aus der Medikationsperiode und dem Mittelwert der Kontrolltage für die Medikamentengruppen mit "Student's t-test" (23) überprüft.

Nach dem gleichen Verfahren wurde bei den Ergebnissen der Doppelblindstudie die Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte der Tagegruppen b), c), d), e) gegenüber a) untersucht (32).

D) ERGEBNISSE

I) Modifikation der Methode der Zuckersäurebestimmung nach Marsh

1) Die Vorbereitung des Materials

Um eine schnellere und für die routinemäßige Anwendung besser geeignete Bestimmungsmethode zu erhalten, wurde die von Marsh (46) angegebene Methode in einigen Punkten modifiziert, das Prinzip jedoch beibehalten. Es wurden andere Reagenzien benützt, wodurch sich die Versuchsbedingungen im Vergleich zu Marsh veränderten (s. auch Material). Als Enzym diente statt der aus Lebern von "Lister strain rats" bereiteten Lösung, die im Handel erhältliche ß-Glucuronidase von helix pomatia (ß-D-Glucuronid glucuronohydrolase, EC 3.2.1.31, Boehringer Mannheim). Damit entfiel der umständliche Herstellungsvorgang.

Als Substrat für das Enzym erwies sich,nach vergleichenden Versuchen mit Phenolphthalein-ß-D-glucuronid für die routinemäßige Bestimmung der Zuckersäure im Urin p-Nitrophenyl-ß-D-glucuronid (MG: 315.2, Serva) als geeigneter.

Sowohl vom Enzym als auch vom Substrat wurden jeweils unmittelbar vor dem Versuch, in 0.1 M Acetatpuffer, pH 4.5 verdünnte Lösungen hergestellt (Enzym 1:500; Substrat 0.005 M). Die Versuche zur Zuckersäurebestimmung wurden ebenfalls in 0.1 M Acetatpuffer, pH 4.5 durchgeführt.

Als Referenzsubstanz für die Hemmung der ß-Glucuronidase durch Saccharo (1:4) lacton wurde Ca-D-Saccharat (s. Material) verwendet. Eine 0.25 mM Zuckersäurelösung wurde hergestellt, indem 4 mg Ca-D-Saccharat in 0.1 M Acetatpuffer, pH 4.5, nach Zugabe von 4 Tropfen rauchender Salzsäure unter Rühren gelöst und mit dem gleichen Puffer auf 50 ml aufgefüllt wurden. Um die Zuckersäure möglichst vollständig in ihre Lactonformen überzuführen,

wurde sie zunächst mit 3 N Salzsäure auf pH 2 gebracht und gekocht. Dabei wurde die maximale Hemmkraft bereits nach 20 minütigem Kochen erreicht (Tab. 2).

Kochzeit	Hemmung (in %) durch		
(min.)	3. nmol	4.7 nmol	16.nmol Zuckersäure/ml Inkubat
20	30	36.2	63.6
30	26	34.2	65.2
40	21	38.5	63.4
60	27	36.2	64.2

Tab. 2: Entwicklung der Hemmkraft von verschiedenen Konzentrationen Zuckersäure (nmol/ml Inkubat) nach 20, 30, 40, 60 min. Kochen bei pH 2

Vor Zugabe der gekochten Zuckersäure zum Analysenansatz wurde ihr pH-Wert auf 3.5 - 4.0 korrigiert, um den für die ß-Glucuronidasereaktion optimalen pH von 4.5 nicht zu verändern.

Zur Bestimmung der Ausscheidung pH-abhängigen Hemmstoffs im Urin wurde ein Teil der Urinproben bei pH 2 vierzig Minuten lang gekocht, um die Zuckersäure in das (1:4) lacton überzuführen. Der andere Teil wurde mit Lauge auf pH 7 - 8 eingestellt und 15 min. lang gekocht, um die pH-unabhängigen Hemmfaktoren der ß-Glucuronidase im Urin zu erfassen. Um den Analysen-pH von 4.5 nicht zu verändern, wurde der pH-Wert des sauer vorbehandelten Urins nach dem Kochen auf 3.5 - 4.0, der des alkalisch vorbehandelten auf 5.5 eingestellt.

2) Ermittlung der für die Zuckersäurebestimmung mit diesen Reagenzien geeigneten Versuchsbedingungen

Zunächst wurde die Aktivität des Enzyms ß-Glucuronidase, und zwar pro ml Lösung bestimmt (U/ml Lösung). Die Einheit der Enzymaktivität ist eine "Unit" (U). Bei der Aktivität 1 U kata-

lysiert das Enzym den Umsatz von 1 µmol Substrat in der Minute. Der Ansatz und die Formel zur Berechnung der Aktivität (U/ml) wurden der "biochemica information" (7) (Boehringer Mannheim) entnommen:

In Küvetten (Normalglas/d = 1 cm) wurde einpipettiert:

0.97 ml 0.1 M Acetatpuffer
0.03 ml 0.1 M Nitrophenyl-ß-D-glucuronidlösung
0.03 ml ß-Glucuronidaselösung ansteigend in 0.1 M Acetatpuffer, pH 4.5, verdünnt: 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300.

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe der 0.03 ml Enzymlösung. Nach kurzem Schütteln wurde die Mischung für 10 min. bei Zimmertemperatur inkubiert (23°C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2.0 ml 0.5 N Natronlauge gestoppt. Die Extinktion wurde bei der Wellenlänge 405 nm gemessen und die Differenz aus Proben und Leerwert (NaOH und Puffer) dE berechnet. Die Aktivität (U/ml) (VA) ergab sich aus der Formel:

$$VA = \frac{V \cdot dE}{d \cdot v \cdot \varepsilon \cdot dt} \quad \text{(U/ml Enzymlösung)}$$

V = Gesamtvolumen des Inkubats (3.03 ml)
v = Volumen der Enzymlösung (0.03 ml)
d = Küvettendurchmesser (1 cm)
ε = Extinktionskoeffizient (18.5 $cm^2/\mu mol$; für p-Nitrophenol)
dt = Inkubationszeit (10 min.)
dE = Extinktionsdifferenz ($E_{Probe} - E_{Leerwert}$)

Aus der Aktivität (U/ml) läßt sich die spezifische Aktivität (s. A., u/mg Protein) berechnen:

$$s.A. = \frac{\text{Aktivität (U/ml)}}{\text{Konzentration}}$$

Es wurde zur Berechnung der spezifischen Aktivität davon ausgegangen, daß 1 ml unverdünnter Enzymlösung 1 mg Enzymprotein entspricht (Herstellerinformation). Für die im Versuch eingesetzten Enzymverdünnungen ergaben sich dabei folgende Werte:

Enzymverdünnung	mg Protein	dE	spez.Aktivität (U/mg Prot.)
1:10	0.003	0.19	1.03
1:25	0.0012	0.148	2.02
1:50	0.0006	0.094	2.6
1:100	0.0003	0.048	2.62
1:200	0.00015	0.030	3.2
1:300	0.0001	0.020	3.8

Tab. 3: Spezifische Aktivität (U/mg Protein) der ß-Glucuronidase von helix pomatia in Abhängigkeit von der Menge eingesetzten Enzymproteins (mg).

Die spezifische Aktivität bei den Verdünnungen 1:50, 1:100, 1:200 entsprachen etwa der vom Hersteller für 25°C angegebenen von 3 U/mg Protein. Die geringere spezifische Aktivität der Verdünnungen 1:10, 1:25 kann damit erklärt werden, daß bei der hohen Enzymkonzentration und relativ niedrigen Substratmengen im Inkubat nicht alle aktiven Stellen des Enzyms mit Substrat besetzt sind und so in Relation zum eingesetzten Protein weniger p-Nitrophenol freigesetzt wird als bei niedrigeren Enzymkonzentrationen. Geeignet für weitere Versuche erwies sich der Einsatz von 0.03 ml 1:50 verdünnter ß-Glucuronidaselösung. Bei dieser Konzentration entwickelte das Enzym annähernd volle Aktivität und die Extinktionen waren groß genug, um eine eventuelle Hemmung feststellen zu können.

In den folgenden Versuchen wurde zur Charakterisierung des Enzyms die Michaeliskonstante (K_m-Wert) für p-Nitrophenylglucuronid bestimmt, um damit eine Vergleichbarkeit mit Leberenzym und Phenolphthaleinglucuronid zu erhalten. Der K_m-Wert entspricht der Substratkonzentration, bei der das Enzym zu 50 % mit Substrat gesättigt ist. Zur Bestimmung wurde dem oben be-

schriebenen Ansatz (ß-Glucuronidase 1:50), p-Nitrophenylglucuronid in ansteigender Konzentration zugegeben (0.03 ml einer 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.08, 0.1 M), nach 10 min. Inkubationszeit die Extinktion gemessen und K_m graphisch nach Lineweaver-Burke (22) ermittelt. Es ergab sich dabei ein Wert von 0.05mM.

Um die für eine deutlich meßbare Hemmung optimale Konzentration an p-Nitrophenylglucuronid festzustellen, wurde die Hemmwirkung bei gleichen Hemmstoffkonzentrationen und unterschiedlicher Substratkonzentration getestet. (Tab. 4)

Als Hemmstoff wurde zunächst Zuckersäure herangezogen. Der Ansatz enthielt in einem Endvolumen von 1.13 ml:

0.97 ml 0.1 M Acetatpuffer, pH 4.5
0.03 ml 0.001 bzw. 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 M p-Nitrophenylglucuronid lösung
0.1 ml 0.05 bzw. 0.5 mM Zuckersäure
0.03 ml 1:50 verdünnte ß-Glucuronidase

Nach 10 min. Inkubationszeit bei Zimmertemperatur, Stop der Reaktion durch Zugabe von 2.0 ml 0.5 N Natronlauge und Extinktionsmessung ergaben sich folgende Werte:

p-Nitrophenyl-glucuronid (mM)	dE ohne Hemmstoff	4.42 dE	mit Zuckersäure nmol/ml Inkubat % Hemmung	44.2 dE	nmol/ml I % Hemmung
0.027	0.029	0.02	31.1	-	-
0.27	0.074	0.058	22.7	0.02	73.
0.54	0.08	0.064	20.	0.026	63.5
1.35	0.086	0.072	16.3	0.043	50.
2.7	0.093	0.090	3.3	0.055	40.9

Tab. 4: Hemmung der ß-Glucuronidase (in %) durch 4.42 und 44.2 nmol Zuckersäure pro ml Inkubat (uM) bei verschiedenen Konzentrationen p-Nitrophenylglucuronid (Inkubationszeit 10 min., Temperatur etwa 23°C)

Die prozentuale Hemmung berechnete sich aus:

$$100 - \frac{\text{dE mit Hemmstoff}}{\text{dE ohne Hemmstoff}} \times 100$$

Da dE der freigesetzten Menge p-Nitrophenol direkt proportional ist, wurden zur Berechnung der prozentualen Hemmung die Werte von dE herangezogen. Der Ansatz für "dE ohne Hemmstoff" enthielt statt Zuckersäure 0.1 ml Puffer.

Unter diesen Versuchsbedingungen zeigte sich, daß bei niedrigen Substratkonzentrationen die starke Hemmung durch Saccharo (1:4) lacton so geringe Extinktionen ergab, daß eine genaue Messung der Hemmung nicht möglich war. Bei hoher Substratkonzentration war dagegen die Hemmung durch die gekochte Zuckersäure zu schwach. Um stärkere Extinktionen zu erhalten und so den Meßbereich zu vergrößern und die Fehlermöglichkeiten zu vermindern, wurden die folgenden Versuche 20 min. bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Bestimmt wurde die Hemmung der ß-Glucuronidase durch sauer bzw. alkalisch vorbehandelten Urin bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Dazu wurde dem oben beschriebenen Ansatz anstatt der Zuckersäure 0.1 ml saurer oder alkalischer Urin zugegeben und die Reaktion gestartet.

p-Nitrophenyl-glucuronid (mM)	dE ohne Hemmstoff	Zugabe von 0.1 ml sauren Urins (8.85 Vol %)		Zugabe von 0.1 ml alkalischen Urins (8.85 Vol %)	
		dE	%Hemmung	dE	%Hemmung
0.027	0.085	0.049	42.4	-	-
0.27	0.285	0.105	63.2	0.105	63.2
0.54	0.440	0.179	59.4	0.240	45.5
1.35	0.475	0.285	40.	0.350	26.4
2.7	0.5	0.372	36.6	0.470	6.0

Tab. 5: Hemmung der ß-Glucuronidase durch 0.1 ml sauer bzw. alkalisch vorbehandelten Urin bei verschiedenen Konzentrationen p-Nitrophenylglucuronid (Temperatur 30°C, Inkubationszeit 20 min.)

dE wurde aus $E_{Probe} - E_{Leerwert}$ berechnet, wobei der Leerwert 1.0 ml Puffer, 0.03 ml p-Nitrophenylglucuronid und die gleiche Menge Urin wie der Probenwert enthielt (0.1 ml).

Nach diesen Versuchen erschien zunächst die Verwendung einer 1.35 mM p-Nitrophenylglucuronidkonzentration am geeignetsten für die Zuckersäurebestimmung im Urin. Es war eine deutliche Hemmung im sauren und alkalischen Bereich zu erkennen. Sie war aber nicht zu stark, so daß auch eine Hemmung durch höhere Urinkonzentrationen gut gemessen werden konnte (Tab. 5).

Um diesen Wert zu bestätigen, wurde mit dieser Substratkonzentration die Hemmung der ß-Glucuronidase durch ansteigende Konzentrationen vorbehandelten Urins bzw. gekochter Zuckersäure bestimmt. Dabei war eine Hemmung bereits bei einer Zuckersäurekonzentration von 0.1 nmol/ml Inkubat und bei einer Urinkonzentration von 1 Vol % sauer vorbehandelten Urins zu erkennen.

Konzentration an Urin im Inkubat (sauer bzw. alkalisch vorbehandelt) (Vol %)	Hemmung durch alkalischen Urin (%)	Hemmung durch sauren Urin (%)
1	0	20.6
3	8.8	30.9
5	16.2	36.8
10	27.9	45.0
20	44.1	64.1
30	51.4	73.5
50	67.9	79.5

Zuckersäurekonzentration (nmol/ml Inkubat)	Hemmung %
0.1	3.1
1.0	13.6
4.0	43.1
0.4	12.2
11.0	55.2

Tab. 6: Hemmung der ß-Glucuronidase in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration (sauer bzw. alkalischer Urin, Zuckersäure) bei 1.35 mM p-Nitrophenylglucuronid (Inkubationszeit 20 min., Temperatur 30°C)

Während dieser Versuche stellte sich heraus, daß die Fehlermöglichkeiten beim Einpipettieren so kleiner Volumina, wie 0.03 ml zumal unter Zeitdruck doch erheblich waren. Als vorteilhafter erwies es sich, gleiche Mengen Enzym bzw. Substrat in einem größeren Volumen dem Ansatz zuzugeben. Es wurde nun statt 0.03 ml 1:50 verdünnter ß-Glucuronidaselösung, 0.3 ml, 1:500 verdünnte einpipettiert, ebenso 0.3 ml 0.005 M p-Nitrophenylglucuronid statt 0.03 ml 0.05 M. Dadurch änderten sich die Konzentrationen geringfügig (s. u.). Um die Versuchsbedingungen zu standardisieren, wurden im folgenden alle Versuche bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Nach einem Zeittest (s. u.) wurde die Inkubationszeit auf 20 min. festgelegt.

Der Ansatz mit dem nun während der gesamten Zuckersäurebestimmung die ß-Glucuronidaseaktivität ohne Hemmstoff bestimmt wurde (100 %-Wert, Standardansatz), enthielt in einem Inkubationsvolumen von 1.6 ml:

1.0 ml 0.1 M Acetatpuffer, pH 4.5
0.3 ml 0.005 M p-Nitrophenylglucuronidlösung. Die Konzentration im Inkubat war 0.938 mM
0.3 ml 1:500 ß-Glucuronidaselösung

Durch Zugabe des Enzyms wurde die Reaktion gestartet. Nach kurzem Schütteln wurde die Mischung 20 min. bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde beendet durch Zugabe von 2.0 ml 0.5 M Natronlauge, die Extinktion bei 405 nm gemessen und dE berechnet, wobei der Leerwert aus Puffer und p-Nitrophenylglucuronid bestand.

Im Gegensatz zu den vorne angegebenen Werten änderte sich die Aktivität des eingesetzten Enzyms unter den standardisierten Versuchsbedingungen. Bei Zugabe verschiedener Mengen ß-Glucuronidase zu eben beschriebenem Ansatz ergaben sich folgende Werte für Volumen und spezifische Aktivität:

Enzymmenge ml, 1:500 verdünnt	mg	dE	Volumen-aktivität (U/ml Lösung)	spezifische Aktivität (U/mg Protein)
0.1	0.0002	0.118	0.011	5.5
0.2	0.0004	0.266	0.013	6.5
0.3	0.0006	0.422	0.014	7.0
0.5	0.001	0.711	0.014	7.0
0.75	0.0015	1.07	0.014	7.0

Tab. 7: Abhängigkeit der Aktivität von ß-Glucuronidase von helix pomatia (Volumenaktivität und spezifische Aktivität) von der eingesetzten Menge Enzymproteins unter den endgültigen Versuchsbedingungen (Temperatur 30°C, Inkubationszeit 20 min., 1.6 ml Inkubationsvolumen)

Die spezifische Aktivität betrug unter diesen Bedingungen 7.0 U/mg Protein. Es wurden pro Ansatz 4.2 mU eingesetzt. Für die verwendete ß-Glucuronidaselösung wurde ein breites pH-Optimum zwischen 3.5 und 4.5 ermittelt. Während die Herstellerfirma ein pH-Optimum von 4.5 - 5.0 angibt (7), konnte bei diesen Versuchen im entsprechenden Bereich ein deutlicher Aktivitätsverlust festgestellt werden (Abb. 4).

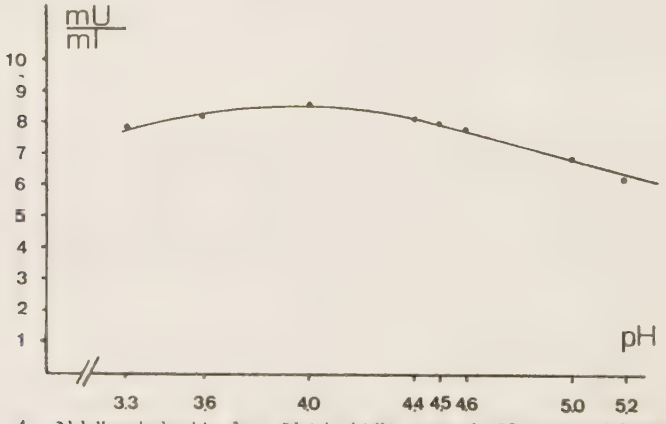

Abb. 4: Abhängigkeit der Aktivität von ß-Glucuronidase von helix pomatia (mU/ml) vom pH-Wert des Analysenansatzes. Versuchsbedingungen wie auf S. 43 beschrieben.

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit wurde der Standardansatz verschieden lange inkubiert. Die Extinktionen durch freigesetztes p-Nitrophenol stiegen dabei linear mit der Zeit an, die Aktivität (U/ml) des Enzyms blieb über 1 Std. annähernd konstant (Abb. 5).

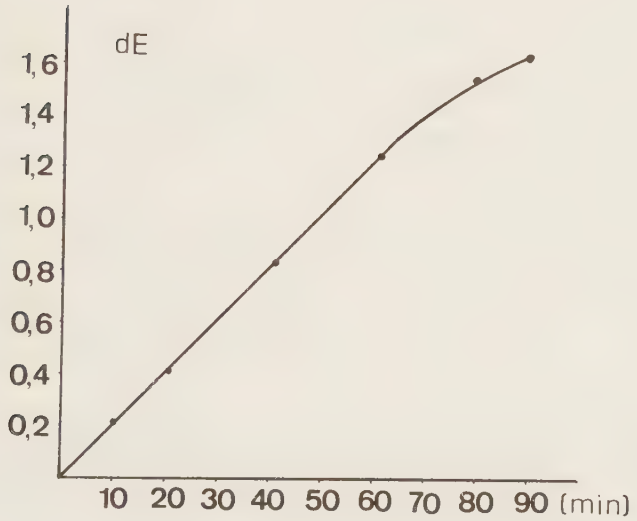

Abb. 5 Abhängigkeit der Aktivität von ß-Glucuronidase von helix pomatia (dE) von der Inkubationszeit (min). Versuchsbedingungen s. Text.

3) Substratauswahl

Versuche mit Phenolphthaleinglucuronid oder p-Nitrophenylglucuronid sollten zeigen, welches der beiden Substrate für die routinemäßige Bestimmung der Zuckersäure im Urin besser geeignet ist.

Die Bestimmung der Michaelis-Konstanten unter den nunmehr standardisierten Bedingungen nach der Methode von Lineweaver-Burke (22) ergab für p-Nitrophenylglucuronid $1.5 \cdot 10^{-4}$ M

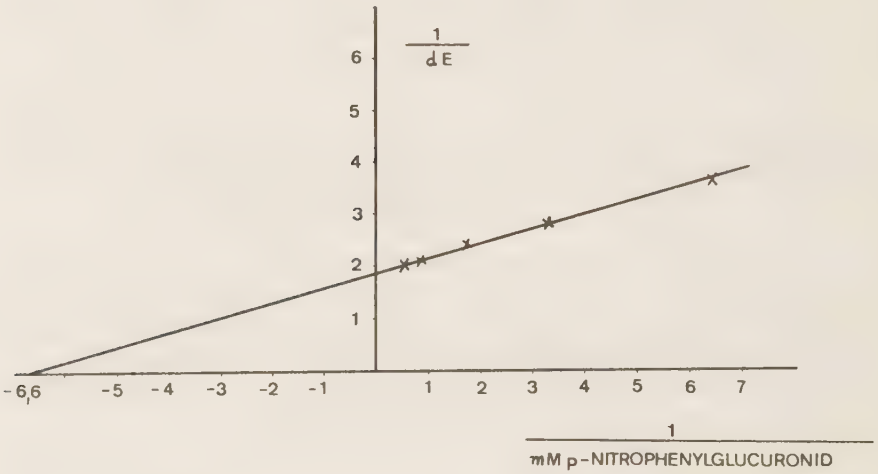

Abb. 6: Bestimmung der Michaeliskonstante der ß-Glucuronidase von helix pomatia mit p-Nitrophenylglucuronid als Substrat (nach Lineweaver-Burke, mit $1/v \triangleq 1/dE$ auf der y-Achse und der reziproken Substratkonzentration = 1/mM p-Nitrophenylglucuronid auf der x-Achse). Standardisierte Versuchsbedingungen, wie auf S. 43 beschrieben.

Der K_m-Wert von Phenolphthaleinglucuronid wurde mit folgendem Ansatz bestimmt (nach "Methoden der enzymatischen Analyse" H. U. Bergemeyer) (6):

4.0 ml 0.1 M Acetatpuffer, pH 4.5
0.5 ml 0.1 bzw. 0.5, 1.0, 5.0 mM Phenolphthaleinglucuronidlösung (in 0.1 M Acetatpuffer, pH 4.5)
0.03 ml 1:20 verdünnte ß-Glucuronidaselösung (helix pomatia)

Durch Zugabe des Enzyms erfolgte der Start der Reaktion. Die Mischung wurde nach Aufschütteln 30 min. bei 38°C im Wasserbad inkubiert. Nach dieser Zeit wurde sie mit 1 N Natronlauge bis

zur Rotfärbung versetzt, mit 0.4 M Glycinpuffer, pH 10.45, auf 10 ml aufgefüllt und bei 546 nm gegen den Leerwert die Extinktion gemessen. Die graphische Ermittlung des K_m-Wertes nach Lineweaver-Burke ergab eine $6.9 \cdot 10^{-5}$ M Phenolphthaleinglucuronidkonzentration. Das Ergebnis zeigt eine höhere Affinität des Enzyms für dieses Substrat als für p-Nitrophenylglucuronid.

Die hier gefundenen K_m-Werte sind vergleichbar den in der Literatur angegebenen Werten, wie die folgende Tabelle zeigt (Tab.8):

Autor	Enzym ß-Glucuronid.	Versuchs-pH	Temp.	K_m pNg	K_m Ppg
Nimmo-Smith(52)	aus Mäuseleber	4.0	38°C	$2.6 \cdot 10^{-5}$ M	$10 \cdot 10^{-6}$ M
	Nippostrongylus	4.0	38°C	$12.2 \cdot 10^{-5}$ M	$113 \cdot 10^{-6}$ M
Szasz (68)	aus menschl. Serum	3.6-4.2	25°C	$7.4 \cdot 10^{-4}$ M	
Preiss Hilz(56)	aus Mastozytom-zellen von Mäusen	4.5	37°C	$1.4 \cdot 10^{-4}$ M	$5.2 \cdot 10^{-5}$ M
biochem. Inf. (7)	"from helix pomatia"	4.5	25°C		$3.9 \cdot 10^{-4}$ M
Levy(41)	aus Mäuse-lebern	5.2	37°C		$130 \cdot 10^{-6}$ M
Saalfrank	von helix pomatia	4.5	30°C	$1.5 \cdot 10^{-4}$ M	38°C $6.9 \cdot 10^{-5}$ M

Tab. 8: Vergleich der K_m-Werte für p-Nitrophenylglucuronid (p-Ng) bzw. Phenolphthaleinglucuronid (Ppg) von ß-Glucuronidase verschiedener Spezies unter Berücksichtigung von pH und Temperatur

Die höhere Affinität von ß-Glucuronidase für Phenolphthaleinglucuronid läßt vermuten, daß eine Hemmung durch entsprechende Mengen an Saccharo (1:4) lacton geringer sein wird als bei p-Nitrophenylglucuronid. Um dies experimentell zu belegen, wurde die Hemmkraft gekochter Zuckersäure bei gleichen p-Nitrophenylglucuronid-Phenolphthaleinglucuronid-Konzentrationen geprüft. Beide Ansätze enthielten eine 0.55 mM Substratkonzentration, 0.2 γ/ug Enzym pro ml Inkubat, gleiche Konzentrationen gekochter Zuckersäure und wurden bei 38°C für 30 min. im Wasserbad inkubiert.

Dieser Versuch zeigte eine stärkere Hemmung der ß-Glucuronidase mit p-Nitrophenylglucuronid, bedingt durch die geringere Affinität dieses Substrates gegenüber dem Enzym (Tab. 9).

Zuckersäurekonzentration (nmol/ml)	Hemmung mit pNg als Substrat (in %)	Hemmung mit Ppg als Substrat (in %)
2.0	62.8	20.
8.0	74.5	41.
80.0	89.4	74.6

Tab. 9: Unterschiede in der Hemmung der ß-Glucuronidasereaktion durch gekochte Zuckersäure bei p-Nitrophenylglucuronid (pNg) und Phenolphthaleinglucuronid als Substrat (Ppg)

Weiterhin wurde die Hemmkraft gekochter Zuckersäure unter den hier erarbeiteten Versuchsbedingungen (s. S. 43) mit p-Nitrophenylglucuronid und unter solchen, die in etwa den von Marsh (46) angegebenen entsprachen, mit Phenolphthaleinglucuronid als Substrat getestet. Dabei war die eingesetzte Substratkonzentration 0.55 mM (Marsh: 0.63) und die ß-Glucuronidase setzte insgesamt 48 µg Phenolphthalein frei (Marsh: 35-40 µg). Auch hier konnte mit p-Nitrophenylglucuronid eine deutlichere Hemmung des Enzyms beobachtet werden (Abb. 7).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die routinemäßige Bestimmung der Zuckersäureausscheidung im Urin p-Nitrophenylglucuronid als Substrat verwendet.

Zusätzlich erwies sich die empfohlene Prozedur des Stoppens der Phenolphthaleinglucuronid abhängigen Reaktion (Versetzen des Inkubats mit Natronlauge bis zur Rotfärbung und Auffüllen mit 0.4 M Glycinpuffer, pH 10.45 auf 10 ml (6)) für die routinemäßige Anwendung als zu umständlich und zeitraubend. Außerdem ist die Bestimmungsmethode mit p-Nitrophenylglucuronid wegen des niedrigen Preises billiger als die Phenolphthaleinglucuronid abhängige.

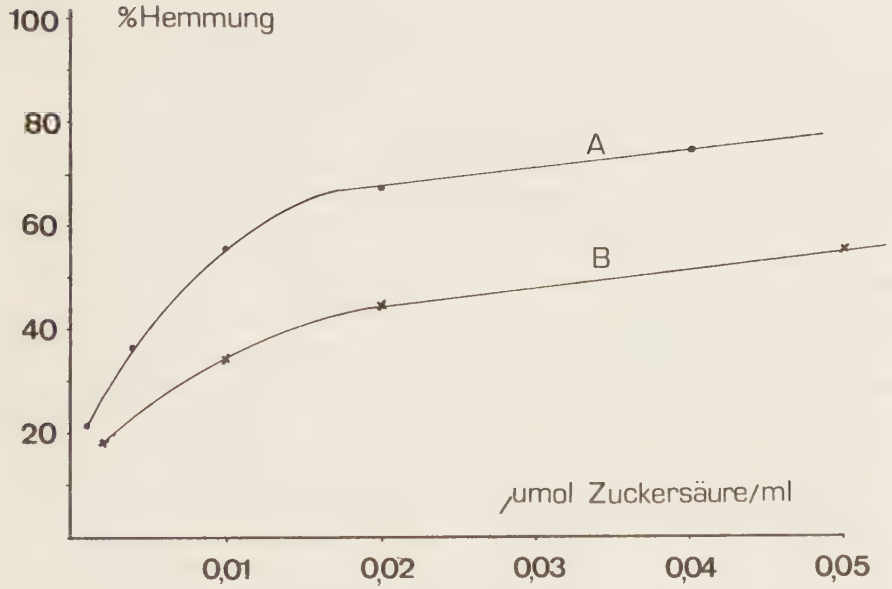

Abb. 7: Unterschiede in der Hemmung von ß-Glucuronidase (%Hemmung) durch Saccharo (1:4) lacton (µmol Zuckersäure/ml) mit 0.938 mM p-Nitrophenylglucuronid und 0.55 mM Phenolphthaleinglucuronid als Substrat. Versuchsbedingungen wie auf S. 48 beschrieben.

4) Charakteristika der Hemmung durch Saccharo (1:4) lacton

a) Um zu überprüfen, ob die Inkubationszeit von 20 Minuten ausreichend ist, eine Hemmung der ß-Glucuronidase durch das Saccharo (1:4) lacton beurteilen zu können, wurde die Entwicklung der Hemmung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht.

Dazu wurden 10 Standardansätze, 10 mit einer Zuckersäurekonzentration von 7.8 nmol/ml Inkubat und ebensoviel mit einer Konzentration von 6.25 Vol % sauer vorbehandelten Urins 3, 6, 9, 12, 15, 16, 18, 20, 24 und 30 Minuten inkubiert (Abb. 8).

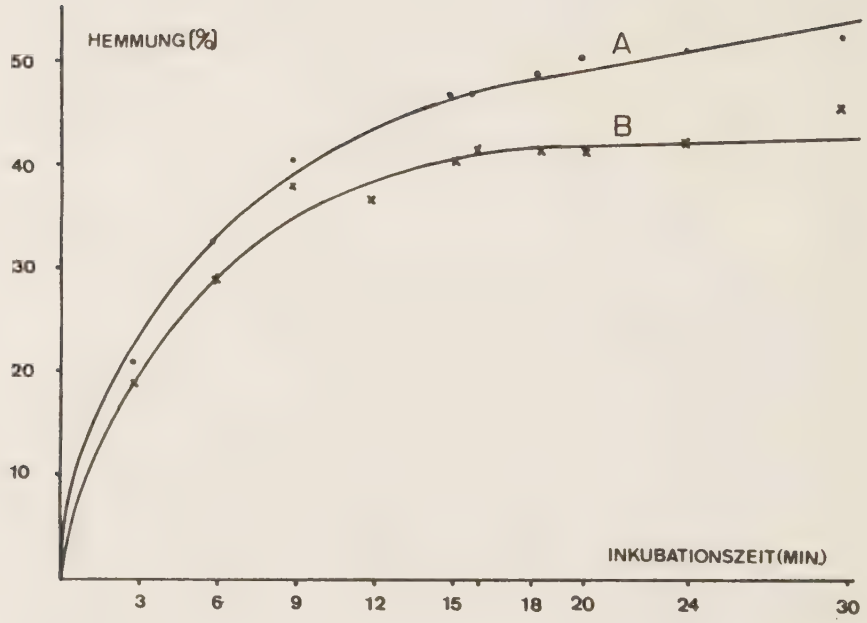

Abb. 8: Entwicklung der Hemmung von ß-Glucuronidase von helix pomatia durch, bei saurem pH gekochte Zuckersäure (7 nmol/ml, •, A, Ca-D-saccharat) und ebenso behandelten Urin (6.25 Vol %, x , B), in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (min).

Wie die Abb. 8 zeigt, entwickelt sich die Hemmung durch sauer vorbehandelten Urin bzw. Zuckersäure in den ersten 10 Minuten schnell und nimmt im weiteren Verlauf der Inkubation nur gering zu. Eine Beobachtung der Hemmung über drei Stunden ergab nur noch einen leichten Anstieg von etwa 5 %. Nach einer Inkubations-

zeit von 20 Minuten hatte die Hemmung annähernd ein Maximum erreicht. Diese Zeit reichte also aus, um das Ausmaß der Hemmung durch Saccharo (1:4) lacton beurteilen zu können.

b) Die Berechnung des pH-abhängigen Hemmstoffs im Urin durch Sub traktion der Hemmkraft alkalisch vorbehandelten von der sauer vorbehandelten Urins bei gleicher Konzentration ist nur gerechtfertigt, wenn sich im alkalisch vorbehandelten Urin kein pH-abhängiger Hemmstoff befindet (46).

Dies wurde experimentell an einer Urinprobe durch sukzessive Behandlung mit Säure und Lauge nachgewiesen. Die durch Säurevorbehandlung bedingte Zunahme der Hemmkraft des Urins wurde durch nachfolgende Behandlung mit Lauge wieder aufgehoben.

Urinkonzentration (Vol %)	Hemmung nach saurer Behandl./alk.Behandl.		Hemmung nach saurer u.nachf. alk. Behandl.
3	20.3	10.2	8.6
6	36.7	21.8	22.3
12	52.6	35.8	36.9

Tab. 10: Reversibilität der säurepotenzierten Hemmung der ß-Glucuronidaseaktivität durch Urin bei nachfolgender alkalischer Behandlung

Um zu belegen, daß die Hemmung durch das Saccharo (1:4) lacton pH-abhängig ist, wurde die Hemmung der ß-Glucuronidase durch alkalisch vorbehandelte Zuckersäure gemessen. Bei ansteigenden Konzentrationen der Zuckersäure lagen die Extinktionen im Bereich der Schwankungen des Kontrollwerts (S. 62). Der 50 % Hemmwert war graphisch nach Dixon (22) wegen der geringen Steigung der Geraden nicht zu ermitteln. Rechnerisch ergaben sich Werte von 356 bis 1214 nmol/ml Inkubat. Im Vergleich dazu lag der 50 % Hemmwert der sauer vorbehandelten Zuckersäure bei 7.6 nmol/ml (S. 63). Wurde die alkalisch vorbehandelte Zuckersäure vor Start der ß-Glucuronidasereaktion über längere Zeit(40-60

Minuten) in dem sauren Milieu des Analyseansatzes (pH 4.5) inkubiert steigerte sich die Hemmung und die 50 % Hemmwerte lagen bei 170 bis 268 nmol/ml Inkubat. Diese Zunahme der Hemmung alkalisch vorbehandelter Zuckersäure in saurem Milieu war wahrscheinlich durch spontane Nachbildung des Saccharo (1:4) lactons aus der nicht hemmenden Zuckersäure bedingt. Auch Marsh beobachtete eine derartige Zunahme der Hemmung in alkalisch vorbehandeltem Urin (46). Um eine eventuelle Nachbildung pH-abhängigen Hemmstoffs in alkalisch vorbehandeltem Urin nachzuweisen, wurden 4 Standardansätze und die gleiche Anzahl Ansätze mit 18 Vol % sauer bzw. alkalisch vorbehandelten Urins inkubiert und die jeweilige prozentuale Hemmung berechnet:

Inkubationszeit (min.)	Hemmung durch sauren Urin (%)	Hemmung durch alk.Urin (%)	Differenz der Hemmung (%)
20	69	33.3	35.7
50	71	39.1	31.7
90	71.4	41.3	30.1
120	72.4	45.8	26.6

Tab. 11: Veränderung der Hemmkraft sauer bzw. alkalisch vorbehandelten Urins mit zunehmender Inkubationszeit

Während mit zunehmender Inkubationszeit die Hemmung durch sauren Urin nur geringgradig zunahm (3.4 %), stieg die des alkalischen um 12.5 % an. Daß diese Steigerung z.T. durch die spontane Umwandlung von Zuckersäure in ihr (1:4) lacton bedingt war, wurde durch folgenden Versuch bestätigt:

Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen vorbehandelten Urins wurden einmal unmittelbar vor Start der Reaktion zusammengestellt, ein anderes Mal erst 180 Minuten stehengelassen, dann durch Zugabe von Enzym gestartet. Dabei konnte bei saurem Urin keine Änderung der Hemmkraft festgestellt werden. Bei alkalischem Urin dagegen ergab sich eine Zunahme der Hemmkraft um etwa 5 %.

Konzentration an alkalisch vorbehandeltem Urin (Vol %)	Hemmung nach Zugabe des Urins (%) unmittelbar vor Start der Reaktion	nach 180 Minuten "Vorinkubationszeit"
3	12.5	18
6	30.4	35.3
12	42.8	47.7
18	52.2	55
30	61.1	64.3

Tab. 12: Zunahme der Hemmkraft alkalisch vorbehandelten Urins bei 3-stündiger Inkubation in saurem Milieu vor Start der Reaktion.

Um den durch Nachbildung pH-abhängigem Hemmstoff in alkalischem Urin bedingten Fehler möglichst klein zu halten, wurde darauf geachtet, daß die Zeit zwischen Einpipettieren des alkalischen Urins und Start der Reaktion 20 Minuten nicht überschritt.

Die Menge (1:4) lacton, die sich während der Inkubationszeit aus der nicht hemmenden Zuckersäure nachbildete, war, wie die Versuche mit alkalisch vorbehandelter Zuckersäure (Ca-D-Saccharat) zeigten, ohne Bedeutung.

c) Ermittlung des Hemmtyps und Bestimmung von K_i

Nach Levy (24) ist Saccharo (1:4) lacton ein kompetitiver Hemmstoff der ß-Glucuronidase. Der Hemmtyp der gekochten Zuckersäure und des bei saurem pH gekochten Urins wurde nach Dixon (22) ermittelt. Dabei wird die Hemmung der Hydrolyse von mindestens zwei Substratkonzentrationen durch ansteigende Konzentrationen Zuckersäure bzw. Urin gemessen. Bei dem Vorgehen nach Dixon wird die Hemmstoffkonzentration auf der Abszisse eines Koordinatensystems zum reziproken Wert der Geschwindigkeit des Substratumsatzes auf der Ordinate in Beziehung gesetzt. Als Maß für die Geschwindigkeit wurde die Extinktion des freigesetzten p-Nitrophenols eingesetzt. Bei den beiden verwendeten Substratkonzentrationen von 0.938 mM und 0.313 mM p-Nitrophenylglucuronidlösung ergab die graphische Darstellung zwei Geraden (Abb. 9 und 1

Bei kompetitiver Hemmung müssen sie sich, wie hier, im negativen Bereich der x-Achse schneiden. Der Schnittpunkt beider Geraden gibt auf der x-Achse den negativen Wert von K_i an, das ist die Hemmstoffkonzentration, bei der das Enzym zu 50 % mit Hemmstoff besetzt ist. Diese Versuche zeigten sowohl für die Zuckersäure als auch für sauer vorbehandelten Urin einen kompetitiven Hemmtyp. Als K_i wurde für die gekochte Zuckersäure aus 4 Bestimmungen ein Wert von 2 nmol/ml Inkubat ermittelt.

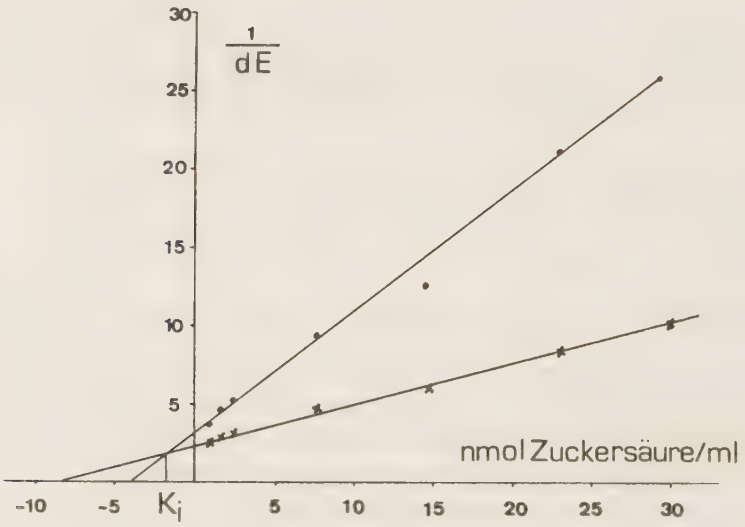

Abb. 9: Darstellung des kompetitiven Charakters der Hemmung von ß-Glucuronidase durch Saccharo (1:4) lacton (nmol Zuckersäure/ml). Die Hemmung wurde bei zwei Konzentrationen p-Nitrophenylglucuronid untersucht, 0.938 mM (x) und 0.313 mM (•) (nach Dixon).

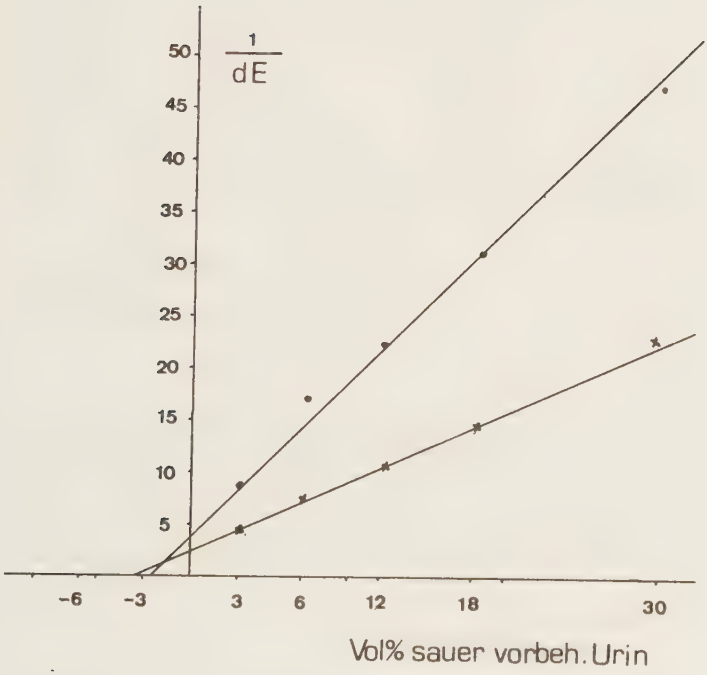

Abb. 10: Kompetitive Hemmung der ß-Glucuronidase durch sauer vorbehandelten Urin (Vol %) nach Dixon. Die Hemmung wurde bei zwei Konzentrationen p-Nitrophenylglucuronid bestimmt, 0.938 mM (x) und 0.313 mM (•).

5) Vorgehen zur Bestimmung der Zuckersäure im Urin

a) Vorbehandlung des Urins und der Zuckersäurelösung

Zunächst wurden die 10 Tagesvolumina eines Probanden langsam aufgetaut und mit Papierfiltern (Selecta-Faltenfilter, Durchmesser 11 cm) in 50 ml-Bechergläser abfiltriert. Von dem Filtrat eines jeden Tagesvolumens wurden je 10 ml für die Behandlung mit Säure und ebensoviel für die Behandlung mit Lauge in 20 ml-Bechergläser pipettiert. Die Gläser wurden mit römischen Ziffern für den jeweiligen Tag (I - X) und mit "a" (Behandlung mit Lauge) bzw. "s" (Behandlung mit Salzsäure) beschriftet.

Es folgte die pH-Einstellung am pH-Meter (Firma Knick) mit Magnetrührer (Cenco). Der Urin in den mit "s" beschrifteten Gläsern wurde mit 3 N Salzsäure auf einen pH zwischen 1.8 und 2.0 gebracht. Der in den mit "a" bezeichneten mit 1 N Natronlauge wurde auf pH 8 eingestellt. Die dazu nötigen Volumina an HCl und NaOH wurden notiert und bei der Berechnung der Urinkonzentrationen im Inkubat berücksichtigt.

Danach wurden die Urinproben in entsprechend bezeichnete, graduierte Reagenzgläser umgeschüttet und in einem Kochtopf mit Reagenzglashalter über einem Bunsenbrenner 40 Minuten (saurer Urin) bzw. 20 Minuten lang (alkalischer Urin) gekocht. Um einen Volumenverlust beim Kochen zu vermeiden, besaßen die Reagenzgläser Spezialstopfen mit einem 20 cm langen Glasrohr (Durchmesser etwa 2 mm), an dem die verdampfte Flüssigkeit kondensierte und ins Glas zurückfloß.

Nach Abkühlen und Umgießen in Zentrifugenbecher wurden die Urinproben 20 min. bei 15 . 10^3 U/min zentrifugiert (Sorvall Kühlzentrifuge, RC 2 B). Danach wurden die sauren Urine mit 1 N NaOH auf einen pH von 3.5 - 4.0, die alkalischen auf 5.5 gebracht, um eine Veränderung der standardisierten Versuchsbedingungen im Inkubat durch eine pH-Änderung zu vermeiden.

Auch die hierbei zugegebenen Volumina der Reagenzien wurden festgehalten. Bei sauer vorbehandeltem Urin stieg der pH nach dem Kochen oft bis auf 4.0 an, vielleicht bedingt durch Entwicklung flüchtiger Säure (CO_2).

Um die im Urin ausgeschiedene Menge Hemmstoff in µmol Zuckersäure ausdrücken zu können, mußte parallel zur Bestimmung im Urin eine Messung der Hemmung durch Saccharo (1:4) lacton durchgeführt werden. Die dafür hergestellte Lösung von Ca-D-Saccharat wurde deshalb mit 3 N HCl auf pH 2 gebracht, 40 min. gekocht und der pH mit 1 N NaOH auf 3.5 - 4.0 korrigiert. Sie wurde also der gleichen Behandlung wie der sauer vorbehandelte Urin unterzogen. Da alkalisch vorbehandelte Zuckersäure nur sehr geringe Hemmung entwickelte, wurde auf diese Behandlung verzichtet (S. 51).

b) Vorbereitung und Durchführung des Versuchs

Für die Versuche standen zwei Reagensglashalter für je 168 Gläser zur Verfügung. Die Reagensgläser (1:14 cm, Ø:1 cm) wurden mit römischen Zahlen, "a" bzw. "s" und arabischen Ziffern beschriftet. Letztere, von 1 - 5, bezeichneten die im Glas befindliche Urinkonzentration. Die verschiedenen Urinkonzentrationen erhielt man, indem man kleiner werdende Volumina 0.1 M Acetatpuffer mit ansteigenden Volumina Urin auf 1 ml auffüllte. Die folgende Tabelle gibt an, was in die einzelnen Reagensgläser gefüllt wurde:

Reagensglas beschriftet	$I_{s1\ bzw.a1}$	$II_{s2/a2}$	$I_{s3/a3}$	$I_{s4/a4}$	I/s5/a5	
0.1 M Acetat puffer, pH 4.5	0.95	0.9	0.8	0.7	0.5	
0.005 M p-Ng	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	
Urin sauer bzw. alkal.	0.05	0.1	0.2	0.3	0.5	
ß-Glucuronidase 1:500	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	Durch Zugabe des Enzyms erfolgt Start d.Reaktion
Urinkonzentration (Vol%)	3	6	12	18	30	

Tab.13: Ansätze zur Bestimmung der Zuckersäureausscheidung im Urin mit der modifizierten Methode. Die Mengenangaben erfolgen in "ml"

Das Inkubationsvolumen betrug immer 1.6 ml, die Substratkonzentration war 0.938 mM, die eingesetzte Enzymaktivität etwa 4.2 mU. Um Störungen durch die Urinfarbe auszuschließen, wurden von jedem Tagesvolumen Probandenurin Leerwerte mitgeführt, die gleiche Urinkonzentrationen und gleiche Substratkonzentrationen wie die oben angeführten Probenwerte enthielten, mit Ausnahme des Enzyms. Anstelle der 0.3 ml ß-Glucuronidase wurden 0.3 ml Puffer zugegeben.

Die Proben alkalisch vorbehandelten Urins wurden nach den sauren eingefüllt, um die Zeit, während der sie sich in saurem Versuchsmilieu befinden und sich spontan pH-abhängiger Hemmstoff nachbildet, konstant kurz zu halten (s.a. S. 52).

Zusätzlich wurde die Hemmung der ß-Glucuronidase durch gekochte Zuckersäure gemessen. Für diese Eichreihe wurden ansteigende Konzentrationen gekochter Zuckersäure und die gleichen Konzentrationen an Substrat und Enzym verwendet, wie bei den Versuchen mit Urin beschrieben. Die Konzentrationen lagen zwischen 0 und 3.0 nmol Zuckersäure pro ml Inkubat (/uM). Man erhielt sie durch Verdünnung der 0.25 mM Stammlösung. Mit Hilfe dieser Eichkurve konnte die im Urin gefundene Menge pH-abhängigen Hemmstoffs in /umol Zuckersäure/ml Urin umgerechnet werden (s. u.). Mitinkubiert wurden jedesmal 3-5 Standardansätze, um die jeweils eingesetzte Enzymaktivität bestimmen zu können.

Die Reagenzgläser mit Puffer, Substrat, Urin bzw. Zuckersäure wurden ins Wasserbad (30°C) gehängt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe der 0.3 ml ß-Glucuronidaselösung mit einer Eppendorfpipette in einem Abstand von 10 Sek. zwischen 2 Proben. Den Leerwerten, die inkubiert wurden, um die durch die Urinfarbe hervorgerufene Extinktion auszugleichen, wurde kein Enzym zugegeben.

Nach 20 min. Inkubationszeit wurde die zuerst gestartete Reaktion durch Zugabe von 2.0 ml 0.5 N Natronlauge mit einem Oxfordpipettor gestoppt. Die gleiche Menge wurde auch dem entsprechenden Leerwert zugegeben, beide Gläser aus dem Wasserbad genommen und in einen daneben stehenden Reagenzglashalter gestellt. 10 Sek. später wurde die an zweiter Stelle gestartete Reaktion gestoppt, nach weiteren 10 Sek. die an dritter Stelle gestartete usw., so daß für alle Reaktionen die Inkubationszeit von 20 min. eingehalten wurde.

Die von einem Probanden über die Dauer des vorne beschriebenen Versuchs pro Tag im Urin ausgeschiedene Menge Zuckersäure konnte an einem Arbeitstag bestimmt werden (ca. 10 Bestimmungen!). Dazu wurden 226 Reagenzgläser gebraucht:

200 für 10 Tagesvolumina Urin (5 Verdünnungsstufen; Probe- und Leerwert)

16 für die Eichkurve (8 Proben bzw. Leerwerte)

10 für die Standardansätze (5 Proben bzw. Leerwerte)

c) Extinktionsmessung und Berechnung der Zuckersäureausscheidung

Nach Stoppen aller Reaktionen wurden die Extinktionen am Photometer Zeiss PMQ II bei der Wellenlänge 405 nm gemessen. Bis zur Messung der Proben vergingen meistetwa 30 - 45 Minuten. Diese Zeit war jedoch ohne Bedeutung, da dE über 2 Stunden konstant blieb.

Die Extinktionsänderung (dE) wurde aus der Differenz von Proben und Leerwert berechnet und zur Ermittlung der Zuckersäureausscheidung herangezogen. Hierbei wurde dem von Marsh beschriebenen (46) Vorgehen gefolgt und die Hemmkraft der im alkalisch vorbehandelten

Urin wirksamen unspezifischen, pH-unabhängigen Faktoren, von der Hemmkraft des sauer vorbehandelten abgezogen. Dazu wurde eine Einheit der Hemmkraft benötigt, die in Anlehnung an Marsh 1 "Hemmeinheit" genannt wurde und die Menge an Hemmstoff darstellte, die unter Standardbedingungen die ß-Glucuronidaseaktivität um 50 % hemmte.

Die Ermittlung dieser "Hemmeinheit" geschah nach Dixon (22). Die aus den Werten für die Hemmstoffkonzentration und den reziproken Werten der Extinktion (s.a. S. 54) konstruierte Gerade schneidet die Abszisse bei dem negativen Wert der Hemmstoffkonzentration, durch die das Enzym zu 50 % in seiner Aktivität gehemmt wird (Abb. 11).

Um die zur Konstruktion der Geraden notwendigen Angaben zu berechnen, wurden die Konzentrationen an Hemmstoff und der dazugehörige gemessene Wert für dieGeschwindigkeit des Substratumsatzes in eine "Olivetti"-Rechenmaschine eingegeben (Abb.11). Bei der Eingabe der Hemmstoffkonzentration wurde stets die Verdünnung durch Zugabe von Salzsäure und Natronlauge während der pH-Einstellung berücksichtigt. Anstelle der Geschwindigkeit v, die sich aus dem Substratumsatz pro Zeiteinheit ergibt, wurde die dazu direkt proportionale Extinktion des freigesetzten p-Nitrophenols verwendet. Aus den 5 eingesetzten Konzentrationen sauer vorbehandelten Urins, den 5 des alkalisch vorbehandelten und den dazugehörigen Extinktionen ergaben sich zwei Geraden. Diese schnitten sich auf der Ordinate in Höhe von $\frac{1}{E\ max.}$ ($\hat{=}1/v\ max$), wofür der Mittelwert der Extinktionen der Standardansätze verwendet wurde. Die Abszisse schnitten sie bei der Konzentration sauren bzw. alkalischen Urins, bei der die ß-Glucuronidaseaktivität um 50 % gehemmt wurde (Abb. 11). Die Gerade aus den 8 eingesetzten Zuckersäurekonzentrationen mit den jeweiligen Extinktionen kreuzte die x-Achse ebenfalls bei der Konzentration einer Hemmeinheit. Aus 25 Versuchen wurde dafür ein Wert von 7.6056 ermittelt (S. 62).

Die Berechnung der Zuckersäureausscheidung und Zuckersäure/ml Inkubat soll an einem Beispiel gezeigt werden:

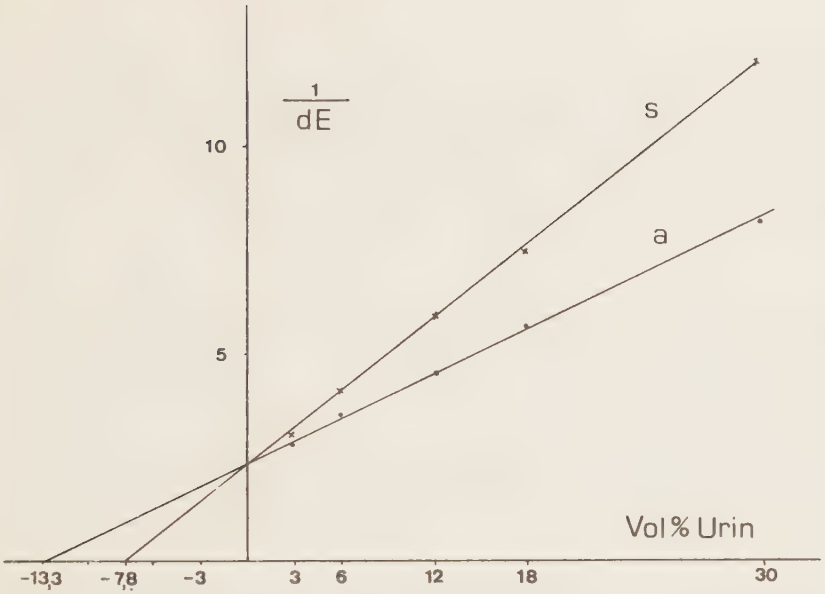

Abb. 11: Ermittlung des 50 % Hemmwerts der ß-Glucuronidase von Sauer (x, S) bzw. alkalisch (', a) vorbehandeltem Urin (Vol %). Die Geraden werden aus den Urinkonzentrationen und den dazu gehörenden reziproken Werten der Extinktion des freigesetzten p-Nitrophenols (1/dE) konstruiert. Die 50 % Hemmwerte (= 1 HE) ergeben sich aus den Schnittpunkten dieser Geraden mit der x-Achse.

Hemmstoffkonzentration (Vol% saurer Urin)	1/dE	Hemmstoffkonzentration (Vol% alk. Urin)	1/dE
0	2.47	0	2.47
3.05	3.27	3.06	2.96
6.1	4.24	6.12	3.70
12.2	6.06	12.24	4.74
18.3	7.4	18.36	6.1
30.5	12.35	30.6	8.26

Aus der Abb. 11 ergibt sich:
der 50 % Hemmwert (I_{50}) liegt für sauren Urin bei - 7.8 Vol %
und für alkalischen Urin bei - 13.3 Vol %
Der Wert von 7.8 Vol % Entspricht einem Volumen von 0.125 ml
1 Hemmeinheit (HE) entspricht somit 0.125 ml sauren Urins

Der Wert von 13.3 Vol% entspricht einem Volumen von 0.213 ml

1 "HE" ≙ 0.213 ml
s. Urin

1 ml sauer vorbehandelten Urins enthält folglich 1/0.125=8 "HE"/ml
s. Urin

1 ml alkalisch vorbeh. Urins enthält 1/0.213=4.7 "HE"/ml
s. Urin

Die Subtraktion der Hemmkraft des alkalischen Urins von der des sauer vorbehandelten bei gleicher Urinkonzentration ergibt 3.3 "HE"/ml Urin und damit die Konzentration des pH-abhängigen Hemmstoffs.

Die Umrechnung dieser Konzentration in nmol Zuckersäure/ml Urin erfolgt durch Multiplikation mit 7.606 (nmol Zuckersäure/ml) der einer "HE" entsprechenden Konzentration an Zuckersäure und ergibt 25.1 nmol Zuckersäure/ml Urin. Die pro Tag ausgeschiedene Menge erhält man durch Multiplikation dieses Wertes mit dem Tagesvolumen Urin, hier 1120 ml, also 28.1 µmol Zuckersäure/Tag.

6) Genauigkeit der Methode

Hauptsächlich durch Pipettier- und Wägefehler bedingt, als auch durch die unterschiedliche Qualität verschiedener - Glucuronidasestammlösungen schwankten die Werte der nicht gehemmten Aktivität der Enzymverdünnungen von 11, 7 - 16 mU/ml. Diese Schwankungen sind für die Genauigkeit der Methode unerheblich, da es hauptsächlich auf das Verhältnis Substrat zu Inhibitor ankommt. Bei jeder Zuckersäurebestimmung wurde mit 3 - 5 Standardansätzen die jeweilige, ungehemmte Enzymaktivität ermittelt und bei der Berechnung im Dixon-plot als $1/E_{max}$ (für I=0) verwendet. Aus allen Extinktionen der Standardansätze wurde ein Mittelwert berechnet, der einer Enzymaktivität von 14.2 mU/ml Inkubat entspricht.

Der Mittelwert aus 64 Werten für die maximale Extinktion lag bei 0.438, mit einer Standardabweichung (S.D.) von 0.0361, einem Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) von 0.00452 und einem Variationskoeffizienten (VK) von 8.2 %.

Mit der Zuckersäurebestimmung im Urin jedes Probanden lief auch eine Eichkurve mit gekochter Zuckersäure mit. Die dadurch ermittelten 50 %-Hemmwerte reichten von 6.18 bis 9.38 nmol Zukkersäure/ml Inkubat (≙ µM). Diese Schwankungen waren unabhängig von der Enzymaktivität und wahrscheinlich durch Pipettier- und Wägefehler verursacht. Zur Berechnung der im Urin ausgeschiedenen Zuckersäure wurde der Mittelwert aus sämtlichen 24 bestimmten 50 % Hemmwerten verwendet. Dieses ergab 7.6056 nmol Zuckersäure/ml (S.D. = 0.090865, S.E.M. = 0.018171, VK = 11.9 %)

Um die Methode zu überprüfen, wurde die Wiederfindung von dem Urin zugesetzter Zuckersäure berechnet. Es wurde, wie beschrieben, in einer Urinprobe die Zuckersäureausscheidung in "HE"/ml Urin bestimmt (endogene Zuckersäure). Einer weiteren Teilmenge dieses Urins wurde eine bekannte Menge Ca-D-Saccharat zugesetzt und ebenfalls die "HE" pH-abhängigen Hemmstoffe gemessen (gefundene Zuckersäure). Die Wiederfindung berechnete sich nach der Formel (38:

$$\text{Wiederfindung (in \%)} = \frac{\text{gefundene Zuckersäure ("HE"/ml)} \cdot 100}{\text{endogene Zs("HE"/ml)+zugesetzte Zs("HE"/ml)}}$$

Aus 13 durchgeführten Wiederfindungsreaktionen ergab sich ein Mittelwert der prozentualen Wiederfindung von 97.146 % (S.D. = 8.98; VK = 9.2 %).
Es wurde daher keine Korrektur der Werte vorgenommen.

ZUCKERSÄURE "HE"/ml

endogen	zugesetzt	berechnete Gesamtmenge	gefundene Gesamtmenge	Wiederfindung (%)
2.678	0.297	2.975	3.062	102.9
2.678	0.594	3.272	3.228	98.7
2.678	1.182	3.860	3.928	101.8
2.678	2.359	5.037	5.563	110.4
2.678	5.897	8.575	7.975	93.0
2.573	1.365	3.938	3.269	83.0
2.573	2.660	5.233	4.910	93.8
2.573	6.644	9.217	10.480	113.7
3.36	0.32	3.68	3.54	96.2
3.36	1.28	4.64	4.41	95.0
3.36	2.56	5.92	5.67	95.8
6.313	29.7	35.013	33.75	96.4

Tab. 14: Wiederfindung (in %) zugesetzter Zuckersäure ("HE"/ml) in Urinproben mit bekannter Zuckersäurekonzentration ("HE"/ml; endogene Zuckersäure)

II) Ergebnisse der chemischen Zuckersäurebestimmung

Die Bestimmung der Zuckersäure in einigen Urinproben von Probanden der Versuchsreihe I geschah mit Hilfe einer Eichkurve (S. 25, Abb. 12).

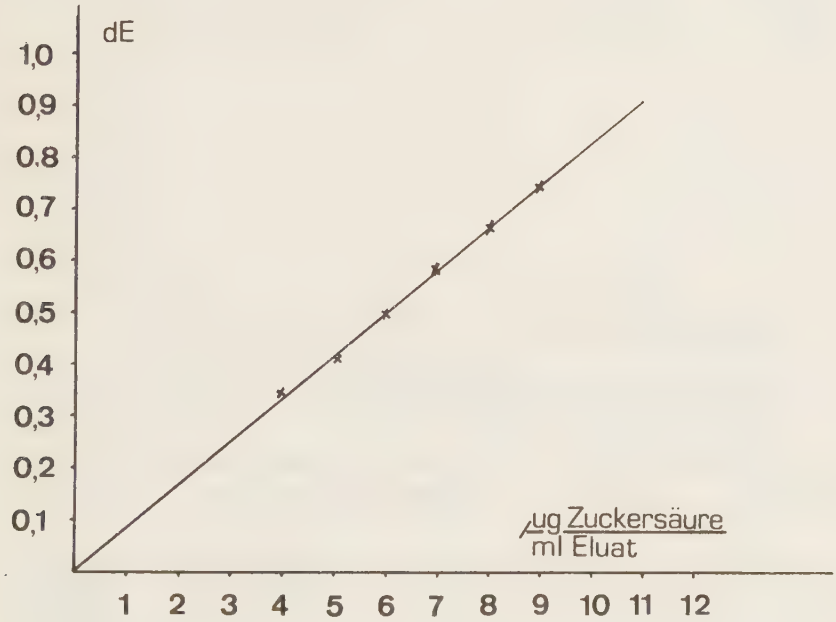

Abb. 12: Eichkurve für die colorimetrische Bestimmung der Zuckersäure. Die Bestimmung wurde mit bekannten Mengen Kaliumhydrogensaccharat (µg/ml Eluat) durchgeführt und die Extinktion (dE) bei 520 nm gemessen.

Dabei ergaben sich folgende Werte:

Tagesvolumen Urin (ml)	eingesetztes Urinvol.(ml)	µg Zuckersäure ml Urin	mg Zuckersäure Tag
1. 1275	2	18.5	22.3
1385	2	21.5	29.7
2660	4	21.25	56.52
2020	3	54.83	110.76
2. 1050	2	136.	142.
2150	4	61.25	131.68
2390	4	46.0	109.94
3. 1200	2	17.0	20.4

Tab. 15: Ergebnisse der chemischen Zuckersäurebestimmung bei Probandenurin der Versuchsreihe I

Mit einer Urinprobe wurde die Wiederfindung zugesetzter Zuckersäure berechnet (Formel s.S. 63 (38))

endogene Zuckersäure (µg/2ml Urin)	zugesetzte Zuckersäure (µg)	berechnete Zuckersäuremenge (µg)	gefundene Zuckersäure (µg)	Wiederfindung (%)
37	99.8	136.8	130	95
37	199.6	236.6	244	103.1
37	50.0	87.0	83.6	96.1

Tab. 16: Wiederfindung (in %) von zugesetzter Zuckersäure (in µg) in Urinproben

Schwierigkeiten traten bei der Regeneration der Säulen auf. Die Säulen wurden nach einer Vorschrift aus dem Serva Katalog (1974) mit dem 3fachen Volumen des Harzes an 8 %iger Natronlauge gewaschen, anschließend mit aqua bidest gespült und mit 0.1 M Natriumboratlösung in die Boratform gebracht. Auf diese regenerierten Säulen wurden 60 µg Zuckersäure, gelöst in 0.1 M Natriumborat gegeben und die Wiederfindung bestimmt. Dabei ergaben sich sehr unterschiedliche Ergebnisse:

Säulennr.	1	2	3	4	5	6	7	8
µg Zuckersäure (gefunden)	41	42.2	33.1	51.0	41.0	41.5	46.7	48
Wiederfindung (%)	68.3	70.3	55.2	85.0	68.3	69.2	77.0	80

Tab. 17: Überprüfung der regenerierten Säulen: Wiederfindung (in %) von 60 µg auf die Säule gegebener Zuckersäure, gelöst in 0.1 M Natriumborat.

Auch mit frisch bereitetem Harz ergaben sich oft nur Wiederfindungen um 60 - 70 %. Da sich noch Zuckersäure auf der Säule befinden konnte, wurde das Harz ein zweites Mal mit 0.05 M Natriumborat - 0.1 M Natriumsulfat gespült:

Säulennr.	1	2	3	4	2. Durchlauf: 1	2	3	4
µg Zuckersäure	54.8	48.7	58.7	51	10	8.7	4.5	5
Wiederfindung (%)	91.33	81.2	97.83	85				

Tab. 18: Überprüfung der regenerierten Säulen: 2 Durchläufe mit 0.05 M Natriumborat 0.1 M Natriumsulfat. Wiederfindung (in %) nach dem ersten Durchlauf

Bei weiteren Versuchen konnte oft trotz schlechter Wiederfindungsergebnisse auch im 2. Durchlauf keine Zuckersäure gefunden werden.

Vergleich der Ergebnisse der chemischen mit denen der enzymatischen Bestimmung:

Ishidate (38) fand mit der chemischen Methode eine durchschnittliche Ausscheidung von 18 mg (12 - 24 mg) Zuckersäure pro Tag beim Menschen. Dieser Wert liegt etwas höher als der von Marsh mit der enzymatischen Methode bestimmten von ungefähr 10 mg pro Tag (46). Auch wir fanden mit der chemischen Methode höhere Werte als mit der enzymatischen.

Proband	chem.Methode (mg/Tag)	enzymat.Methode (mg/Tag)	Differenz (mg)
Ze	22.3	3.9	18.4
	29.7	9.8	19.9
	56.52	28.7	27.82
	110.76	66.71	44.05
He	20.4	12.27	8.13
Zu	142.	155.	-13.
	131.68	95.2	36.48
	109.94	104.24	5.7

Tab. 19: Vergleich der chemisch bestimmten Zuckersäureausscheidung mit der auf enzymatischem Wege erhaltenen bei 3 Probanden der 1. Versuchsreihe. Die Umrechnung der auf enzymatischem Wege gefundenen Werte von molaren Einheiten in mg/Tag erfolgte durch Multiplikation mit dem Molekulargewicht von Ca-D-Saccharat (320.27).

Trotz teilweise erheblichen Unterschieden der Werte zeigt sich doch beim Probanden Ze (Phenobarbitalgruppe I), sowohl bei chemischer als auch bei enzymatischer Bestimmung eine Zunahme der Zuckersäureausscheidung im Urin (s. Ergebnisse). Die bei der enzymatischen Bestimmung gefundenen, bereits an den Kontrolltagen der Versuchsreihe stark erhöhten Werte für die Zuckersäureausscheidung von dem Probanden Zu wurden durch die chemische Methode bestätigt.
Die vorhandenen Unterschiede könnten vielleicht durch vermehrte Ausscheidung von Säuren, die die chemische Bestimmung stören, erklärt werden; eine Interferenz mit gleichzeitig anwesendem Phenobarbital und dessen Metaboliten ist ebenfalls möglich.

III) Ergebnisse der Probandenversuche

1) Ergebnisse der Zuckersäurebestimmung in der Versuchsreihe I

a) Placebogruppe

Die Probanden, die 14 Tage lang mit Placeboformen wirksamer Medikamente behandelt wurden, wiesen während der gesamten Versuchsdauer keine statistisch signifikante Änderung der Zuckersäure ausscheidung im Urin auf:

Tag	He	Gr	An	Gl	Dü	Sa	Initialen
1.	38.27	47.02	15.17	25.96	42.38	26.04	Kontrolltage ohne Medikation
2.	29.03	48.04	27.0	24.76	31.61	33.41	
3.	39.88	47.19	24.36	24.14	14.51	32.98	
6.	32.89	28.02	25.78	17.42	21.87	33.07	
8.	26.87	32.86	32.54	10.28	9.59	24.08	
10.	27.65	28.31	15.12	25.7	28.46	29.98	Medikations-periode (Placebo)
14.	19.95	33.47	23.01	22.63	16.06	46.29	
18.	57.68	49.45	21.79	22.42	22.16	27.99	
19.	27.79	37.38	17.95	21.62	26.34	37.68	Periode nach der Medikation (Placeb
21.	64.6	41.83	18.43	37.74	28.52	45.14	

Tab. 20: Zuckersäureausscheidung der Probanden der Placebogruppe (/umol/Tag)

statistische Auswertung siehe S. 73

b) Clemastinegruppe

Die Probanden, die mit 6mg Clemastine pro Tag [illegible] behandelt wurden zeigten folgende Werte der Zuckersäureausscheidung - Zuckersäureausscheidung:

Tag	Eh	Sh	Ku	Düw	Zü	Zu	Initialen
1.	15.85	36.55	33.93	20.19	44.06	377.06	Kontrolltage
2.	15.52	21.54	24.48	29.73	60.61	485.24	
3.	25.88	49.33	29.2	28.06	35.92	243.7	
6.	29.87	23.45	41.68	8.93	37.77	297.77	
8.	15.96	17.74	30.67	17.96	24.86	213.92	
10.	12.38	22.04	25.15	22.67	48.89	325.76	
14.	20.88	33.27	14.21	16.92	28.75	161.82	Medikations-periode (Tavegil)
18.	6.18	16.52	37.99	25.24	31.41	334.61	
19.	15.03	18.0	24.67	28.4	37.91	319.92	
21.	16.64	59.06	34.69	21.99	46.47	335.2	Nach Medikation

Tab. 21: Zuckersäureausscheidung (µmol/Tag) bei Probanden die Clemastine (Tavegil®) (6 mg/Tag) erhalten haben.

Die extrem hohen Werte des Probanden Zu, die unabhängig von Clemastine waren, wurden, um eine Verzerrung des Ergebnisses der Clemastinegruppe zu vermeiden, bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt (siehe auch S. 76).

c) Phenobarbitalgruppe

Ein deutlicher Anstieg der Zuckersäureausscheidung war bei den Probanden zu erkennen, die 300 mg Phenobarbital pro Tag erhielten.

Tag	Ha	Wa	Ze	Fe	Le	Gu	Ri	Initialen
1.	54.5	33.3	12.09	16.83	83.52	28.06	16.5	Kontroll-
2.	45.29	34.59	6.58	7.41	70.06	24.3	10.33	tage
3.	63.73	31.92	8.31	10.1	72.41	32.92	16.75	
6.	107.91	39.85	30.49	36.13	129.34	37.86	44.2	
8.	88.9	64.87	38.22	27.94	165.52	71.58	34.44	Medikations-
10.	99.17	151.61	89.55	39.0	320.59	100.85	97.77	periode (Pheno- barbital)
14.	138.82	261.39	144.32	61.57	280.63	153.04	137.64	
18.	211.62	194.4	109.88	96.4	349.84	169.27	165.59	
19.	147.58	255.1	182.86	96.4	405.09	206.45	228.16	Nach Medi-
21.	237.52	202.07	208.14	37.43	330.58	233.14	210.78	kation (Pheno- barbital)

Tab22:Zuckersäureausscheidung (/umol/Tag) der Probanden der Phenobarbitalgruppe (300 mg/Tag)

2) Bestimmung der ß-Glucuronidase im Probandenserum

Vor und nach der Medikationsperiode wurde den Probanden aller Gruppen Blut entnommen, um die ß-Glucuronidaseaktivität im Serum zu bestimmen. Dabei zeigten die Probanden der Phenobarbitalgruppe nach Behandlung eine signifikante Zunahme der ß-Glucuronidaseaktivität gegenüber dem Wert vor Behandlungsbeginn, nach Placebogabe blieb sie unverändert, nach Clemastine stieg sie leicht, aber nicht signifikant an.

Der Vergleich mit den von Szasz (46) angegebenen Normalwerten, für Männer: 0.35 - 1.32 mU/ml Serum, für Frauen: 0.22 - 0.99 mU/ml ergab, daß die von uns nach Phenobarbitalgabe gefunde-

nen Werte (Abb. 13) nur knapp über diesem Normalbereich liegen. Die Ursache dafür ist möglicherweise die lange Inkubationszeit in saurem Milieu (5 Stunden), während der sich, aus der im Serum von Probanden der Phenobarbitalgruppe erhöhten Zuckersäure, das, die Enzymaktivität hemmende Saccharo (1:4) lacton gebildet hat. Daraus würde eine "in vitro" niedrigere Enzymaktivität resultieren, die unter physiologischen Bedingungen im Serum nicht vorliegt. Okada und Mitarbeiter (54) stellten mit der chemischen Methode bei epileptischen Patienten, die Anticonvulsiva erhielten, eine gegenüber unbehandelten Patienten stark erhöhte Zuckersäurekonzentration im Serum fest. Die unbehandelten Personen hatten eine Zuckersäurekonzentration von 32 ± 4 µg/dl Serum, die behandelten eine von 101 ± 11 µg/dl Serum (54). Vor Bestimmung der ß-Glucuronidaseaktivität im Serum könnte die Zuckersäure durch Dialysieren des Serum entfernt werden (27).

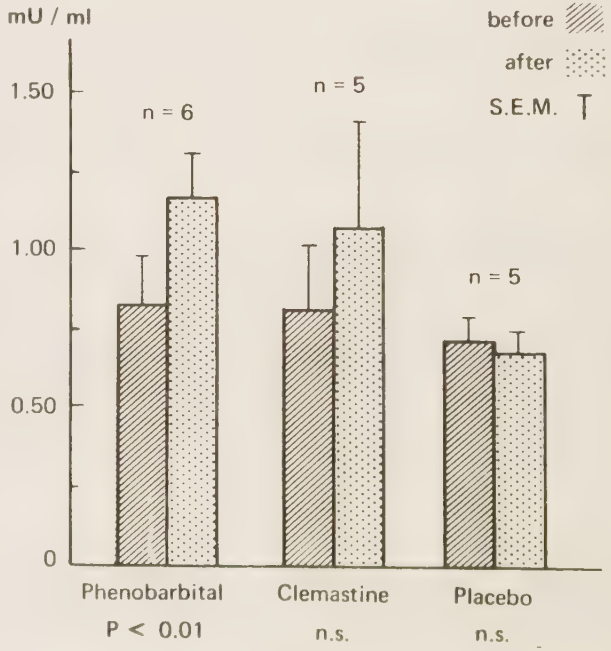

Abb. 13: Aktivität (mU/ml der ß-Glucuronidase im Serum von 16 männlichen Probanden vor und nach 14-tägiger Behandlung mit 300 mg Phenobarbital (n=6),6 mg Clemastine,(n=5) pro Tag und Placebo (n=5).Angegeben sind die Mittelwerte der Aktivität mit dem Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) p gibt die Signifikanz des Unterschieds zwischen dem Wert vor und dem nach Behandlung an.

IV) Ergebnisse der Versuchsreihe II

Bei Probanden, die 5 Tage lang mit 500 mg Phenobarbital pro Tag behandelt wurden, war eine Zunahme der Zuckersäureausscheidung festzustellen.

Tag	Ja	Ber	Ba	Ha	Bet	Initialen
1.	14.79	22.6	40.0	37.49	26.89	Kontroll-periode
2.	31.74	16.39	49.05	60.38	38.03	
3.	24.42	47.02	71.37	58.75	33.51	
4.	38.14	41.68	61.56	80.99	35.66	Medikations-periode (Phenobarbital)
5.	55.46	36.16	118.56	70.18	75.42	
6.	55.15	61.9	128.75	134.16	101.51	
7.	47.18	84.22	157.14	130.42	128.57	
8.	77.84	86.92	208.06	184.12	149.23	Periode nach der Medikation (Phenobarbital)
9.	83.59	76.77	212.63	189.1	154.61	

Tab. 23: Zuckersäureausscheidung (µmol/Tag) im Urin von Probanden, die 500 mg Phenobarbital/Tag erhielten. Tage entsprechend dem Aufenthalt im Klinikum

V) Statistische Auswertung der Ergebnisse

a) Versuch I

Bei der Überprüfung der Signifikanz der Unterschiede zwischen der Zuckersäureausscheidung der Behandlungstage und der an den Kontrolltagen ergab sich für die Phenobarbitalgruppe bereits am 2. Behandlungstag ein signifikanter Anstieg.

Tag	1	2	3	6	8	10	14	18	19	21
Placebo	32.5	32.3	30.5	26.6	22.7	25.9	26.9	33.6	28.1	39.4
	4.921	3.392	4.853	2.521	4.264	2.223	4.540	6.475	3.297	6.416
Tavegil*	30.1	30.6	33.7	26.3	21.4	26.2	22.8	23.5	24.8	35.8
	5.257	7.905	4.257	6.510	2.763	6.069	3.585	5.587	4.041	7.790
Phenobarbital	35.0	28.4	33.7	60.8	70.2	128.4	168.2	185.3	213.1	208.5
	9.729	8.890	9.628	15.18	17.96	34.34	28.99	31.66	36.55	32.97
				p<0.01	p<0.01	p<0.02	p<0.005	p<0.001	p<0.005	p<0.001

Tab. 24: Zuckersäureausscheidung (µmol/Tag) im 24 Stundenurin von männlichen Probanden vor, während und nach Behandlung mit Placebo (n = 6), 300 mg Phenobarbital/Tag (n = 7) oder Clemastine (n = 5) 6 mg/Tag. p gibt die Signifikanz des Unterschieds zwischen dem Wert jedes Tages und dem Mittelwert der Kontrollperiode an. Eingetragen sind der Mittelwert der einzelnen Tage (1. Zeile) und S.E.M. (2. Zeile) aus (32) S. 332

Bei Überprüfung der Signifikanz der Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Tagegruppen b), c), d), e) (S. 35) und dem Mittelwert der Gruppe der Kontrolltage a) zeigte die Clemastinegruppe einen signifikanten Abfall in der Zuckersäureausscheidung zum Mittelwert der Tage 10, 14 und 18 (Tab. 25)

	MW der Tage 6,8	MW der Tage 10,14,18	MW der Tage 19,21	MW der Tage 10,14,18,19,21
Placebo (n = 6)	24.61 n.s.	28.78 n.s.	33.75 n.s.	30.77 n.s.
Clemastine (n = 5)	23.89 n.s.	24.16 p<0.02[a]	30.287 n.s.	26.61 p<0.02[a]
Phenobarbital (n = 7)	65.52 p<0.005	160.61 p<0.005	210.8 p<0.001	178.5 p<0.001

Tab. 25: Mittelwerte der Zuckersäureausscheidung der Tagegruppen b), c), d), e) (s.S.35) (µmol Zs/Tag) p gibt die Signifikanz des Unterschieds zwischen den Werten dieser Gruppen und den Werten der Kontrolltage an, a bedeutet Abnahme (32, S. 330).

b) Versuch II

Die Zunahme der Zuckersäureausscheidung war auch bei diesen Probanden bereits nach 2 Behandlungstagen signifikant.

	Kontrolltage		Medikationsperiode				danach		
Tage	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MW	28.4	39.1	47.0	51.6	71.1	96.3	109.5	141.2	143.3
S.E.M.	4.686	7.493	8.437	8.651	13.67	16.416	19.485	25.824	27.407
P				$p<0.02$	$p<0.02$	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.01$

Tab. 26: Bestimmung der Signifikanz ($p<0.05$) des Unterschiedes zwischen den Mittelwerten der Zuckersäureausscheidung (/umol/Tag) während und nach Behandlung mit 500 mg Phenobarbital/Tag; n = 5; und dem Mittelwert der Kontrolltage. Angegeben sind der Mittelwert und S.E.M., Tage entsprechend dem Aufenthalt im Klinikum.

VI) Vergleich der Ergebnisse

a) Versuch I

Ein Proband der Clemastinegruppe wies bereits an den Kontrolltagen stark erhöhte Zuckersäuremengen im Urin auf (Zu, s. Tab. 21). Eine zweite enzymatische und eine zusätzliche chemische Bestimmung bestätigten diese extremen Werte. Auf Befragen gab der Proband nachträglich zu, Methaqualon (MTQ; 2-methyl-3-O-tolyl-4 (3H) quinazolinone) eingenommen zu haben. Dies könnte über einen eventuellen induktiven Effekt zur Erhöhung der Zuckersäureausscheidung geführt haben. Auch Nayak und Mitarbeiter (51) beobachteten bei 8 Probanden nach 28 tägiger Gabe von Metaqualon einen 2-3 fachen Anstieg der Zuckersäureausscheidung im Urin. Die Ergebnisse dieses Probanden wurden bei der statistischen Auswertung der Clemastinegruppe nicht berücksichtigt.

Bei den übrigen Probanden der Clemastine- und der Placebogruppe konnte während und nach der Behandlung keine Steigerung der Zuckersäureausscheidung festgestellt werden. Die graphische Darstellung der Mittelwerte der einzelnen Versuchstage ergab zwei annähernd parallel verlaufende Kurven mit leichtem Abfall zu Beginn und geringem Anstieg gegen Ende der Beobachtungszeit (Abb. 14). Nach diesen Ergebnissen scheint Clemastine(Tavegil^{R}) zumindest, was die Zuckersäureausscheidung angeht, keine induktive Wirkung zu besitzen. Eine entgegengesetzte inhibitorische Wirkung könnte wegen des signifikanten Abfalls zu Beginn der Behandlung zwar vermutet werden, erscheint aber bei der fast gleich starken Abnahme nach Placebobehandlung wenig wahrscheinlich.

Der etwa 6fache Anstieg der Zuckersäureausscheidung nach 14tägiger Behandlung mit 300 mg Phenobarbital zeigt die Empfindlichkeit dieses Parameters zum Nachweis von Arzneimittelnebenwirkungen bei chronischer Medikamenteneinnahme (Abb. 14).

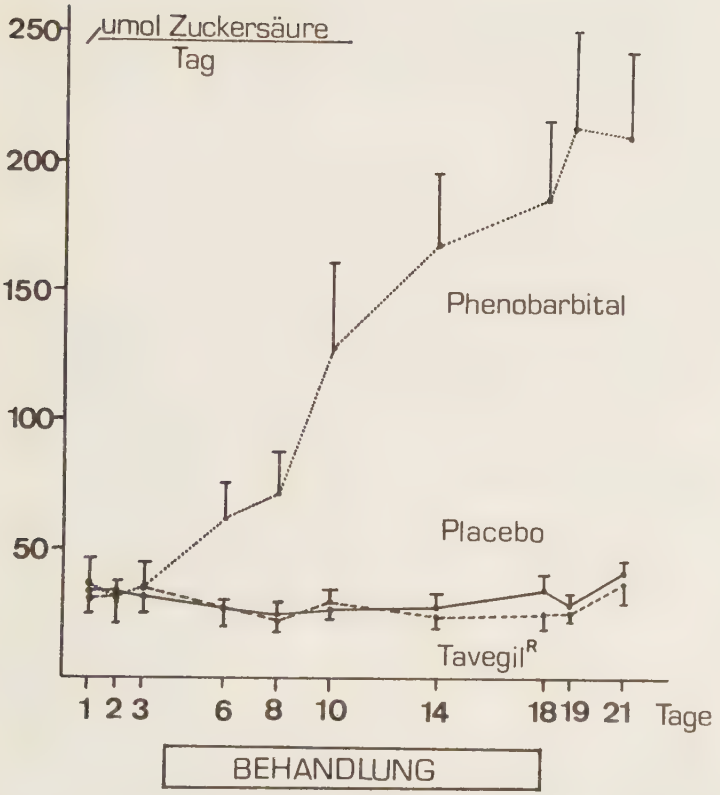

Abb. 14: Zuckersäureausscheidung (µmol/Tag) von 18 männlichen Probanden nach 14 tägiger Behandlung mit Phenobarbital (300 mg pro Tag, n = 7, punktierte Linie, Clemastine (Tavegil®) (6 mg/Tag, n = 5, durchbrochene Linie) und Placebo (n = 6, durchgezogene Linie). Eingezeichnet sind die Versuchsdauer (Tage), die Behandlungsdauer (Behandlung) und die Mittelwerte der Zuckersäureausscheidung mit dem jeweiligen Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.).

b) Vergleich der Ergebnisse der beiden Phenobarbitalgruppen aus Versuch I und II

Bei beiden Gruppen war die Zunahme der Ausscheidung an pH-abhängigem Hemmstoff im Urin bereits am 2. Behandlungstag gegenüber dem Mittelwert der Kontrolltage signifikant und nach Absetzen der Behandlung ließ sich eine weitere Steigerung der Zuckersäureausscheidung erkennen.

Nach 14tägiger Gabe von 300 mg Phenobarbital pro Tag kam es zu einem Anstieg um den Faktor 5.72. Nach 5 Tagen, 500 mg pro Tag, nahm die Ausscheidung um den Faktor 3.24 zu. Während nach verschieden langer Medikationsperiode ein deutlicher Unterschied in der Zuckersäureausscheidung festgestellt werden konnte, war die ausgeschiedene Menge nach 6 Tagen Phenobarbitalbehandlung etwa gleich groß (Tab. 27), was darauf schließen ließ, daß schon mit 300 mg eine maximale Steigerung der Zuckersäureausscheidung erreicht war, so daß bei diesen Versuchsbedingungen eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung nicht herzustellen war.

Phenobarbital-dosis	Mittelwert Kontrolltage	Phenobarbitalbehandlung Tag 1	2	3	4	5	6
300 mg/Tag (n = 7)	32.4	-	60.8	-	70.2	-	128
500 mg/Tag (n = 5)	33.7	47.0	51.6	71.3	96.4	109	141

Tab. 27: Ausscheidung von Zuckersäure (/umol/Tag) im Urin vor und während Behandlung mit 300 und 500 mg Phenobarbital/Tag bei gesunden männlichen Probanden (aus 63, S. 493).

In Abb. 15 sind die Werte der Zuckersäureausscheidung der einzelnen Probanden nach 14tägiger Behandlung mit 300 mg Phenobarbital (punktierte Säulen) dem Mittelwert der Kontrolltage aller Teilnehmer (32.7 /umol/Tag, S.D. = 15.9, schwarze Säule) gegen-

übergestellt. 6 von 7 Probanden befanden sich mit ihren Werten über der Linie, die den Mittelwert + 6 Standardabweichungen kennzeichnet. Nach 6tägiger Behandlung (waagerechte Linie in den Säulen) lagen 6 Probanden über dem Bereich "Mittelwert + 3 S.D.". Das bedeutet, daß eine starke Induktion durch Medikamente, wie z.B. Phenobarbital, sogar ohne Kenntnis des jeweiligen Kontrollwertes vermutet werden kann, wenn die Ausscheidung den dafür ausschlaggebenden Grenzwert "Mittelwert + 3 S.D." = 80.4 µmol Zs/Tag übertrifft (63). Die Werte bei 4 von 5 Probanden der 2. Gruppe überschritten bereits an dem nach 5tägiger Gabe von 500 mg Phenobarbital folgenden Tag diesen Grenzwert (Abb. 16).

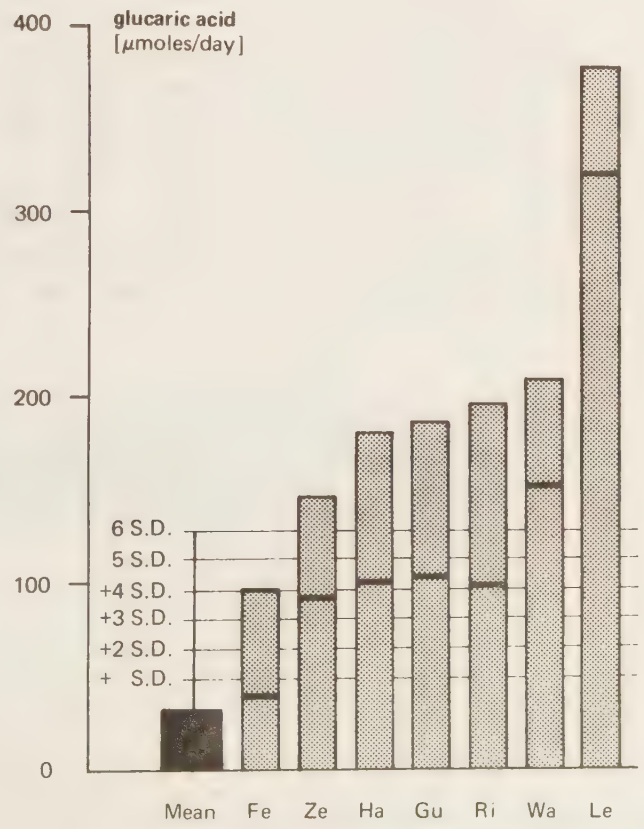

Abb. 15: Zuckersäureausscheidung (µmoles/day) bei 7 männlichen Probanden (Initialen) nach 14tägiger Phenobarbitalbehandlung (300 mg/Tag) im Vergleich zum Mittelwert aller 23 Probanden unter Kontrollbedingungen (Mean). Die Markierung des Mittelwerts und sechs Vielfachen seiner Standardabweichung (32.7±15.9 µmol Zuckersäure/Tag) zeigt, daß die Werte nach Behandlung außerhalb der Signifikanzschranke (MW+ 3 S.D.) liegen. Die Balken in den punktierten Säulen geben die Zuckersäureausscheidung nach 6 Tagen an (aus(63), S. 491).

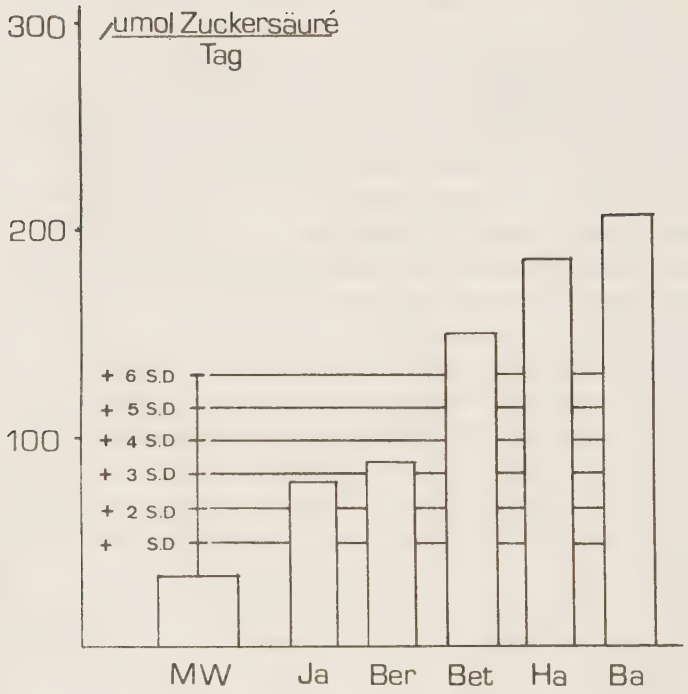

Abb. 16: Zuckersäureausscheidung (µmol/Tag) bei männlichen Probanden (Initialen) nach 5tägiger Behandlung mit Phenobarbital (500 mg/Tag) im Vergleich zum Mittelwert aller 23 Probanden unter Kontrollbedingungen (MW). Markierung des Mittelwerts und 6 Vielfachen seiner Standardabweichung wie in Abb. 15.

Die Abb. 17 zeigt den Anstieg der Zuckersäureausscheidung im Urin bei den Probanden beider Phenobarbitalgruppen als Prozent des individuellen Kontrollwertes. Dabei ergab sich bei niedrigen Kontrollwerten eine höhere prozentuale Zunahme als bei hohen Ausgangswerten.

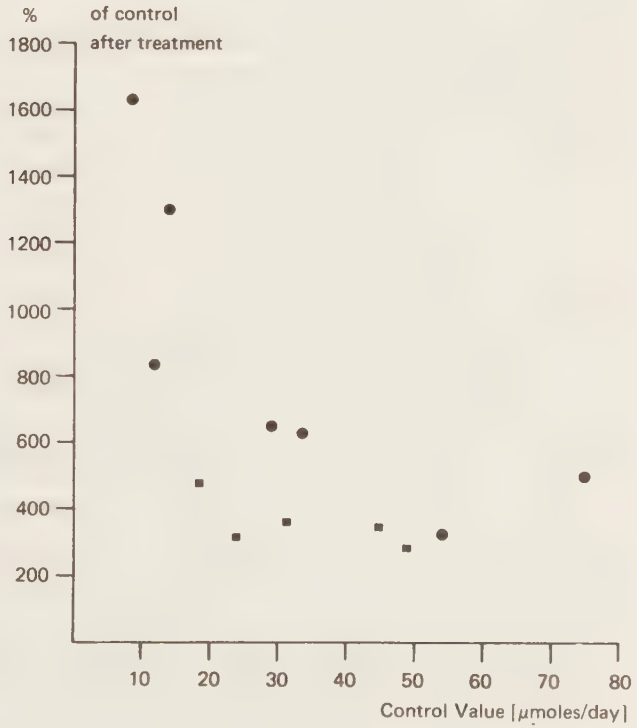

Abb. 17:
Anstieg der Zuckersäureausscheidung (% of control after treatment) nach Phenobarbitalbehandlung in Abhängigkeit vom jeweiligen Kontrollwert (control value [μmoles per day] vor der Medikation. Prozentualer Anstieg der Ausscheidung der Probanden, die 14 Tage 300 mg/Tag bekamen (•). (▪) Probanden, die 5 Tage mit 500 mg/Tag behandelt wurden (aus (63), S. 492) modifiziert.

c) Vergleich der Ergebnisse der Zuckersäurebestimmung mit anderen Parametern einer Induktion hydroxylierender Enzyme der Leber.

In den Arzneimittelstoffwechsel ist eine Vielzahl von Enzymen eingebaut. Da durch verschiedene Pharmaka die Bildung unterschiedlicher Enzyme induziert werden kann, besitzt ein negatives Ergebnis bei der Bestimmung eines Parameters des Arzneimittelstoffwechsels wenig Aussagekraft über die induzierenden Eigenschaften eines Medikaments. Erst eine Messung mehrerer Parameter, die verschiedene Wege und Seitenwege des Arzneimittelstoffwechsels repräsentieren, erlaubt eine Aussage über die Wirksamkeit Pharmakons als Enzyminduktor. Die oben dargestellten Ergebnisse betrafen bisher den Einfluß von Medikamenten auf die Zuckersäureausscheidung und sind ein Teil der im folgenden genannten Untersuchungen. Um die induzierende Wirkung des Tavegil im Vergleich zu Placebo und Phenobarbital, als Standard für eine Induktion, zu überprüfen, wurde bei Probanden, neben der Zuckersäureausscheidung, die des 6 ß-Hydroxycortisols im Urin bestimmt, und die Gamma-Glutamyltranspeptidaseaktivität im Serum gemessen. Weiterhin wurde die Elimination von Amidopyrin, als Testsubstanz bestimmt (31,63). Dabei zeigt keiner der untersuchten Parameter nach der Behandlung mit Clemastine (Tavegil^{R}) Auswirkungen im Sinne einer Enzyminduktion.

Phenobarbital führte zu einem Anstieg aller Parameter, was eine generelle Induktion hydroxylierender, mikrosomaler Enzyme erkennenließ.(Abb. 18). Die Ausscheidung von 6 ß-Hydroxycortisol war gegenüber den Kontrolltagen signifikant erhöht und wies auf eine Aktivitätssteigerung der 6 ß-Hydroxylase in den Lebermikrosomen hin. Die Gamma-Glutamyltranspeptidaseaktivität war nach 14-tägiger Phenobarbitalbehandlung doppelt so hoch wie vorher.

Auch die pharmakokinetischen Daten des Amidopyrin waren entsprechend der eingetretenen Induktion der abbauenden, oxydierenden Enzyme durch Phenobarbital verändert. So war die Halbwertszeit einer oral verabreichten Testdosis von 600 mg nach 14 Tagen 300 mg Phenobarbital pro Tag von 2.05 Std. auf 1.32 Std. abgefallen und entsprechend war die Eliminationskonstante von 0.346/Std. auf 0.548/Std. angestiegen (63).

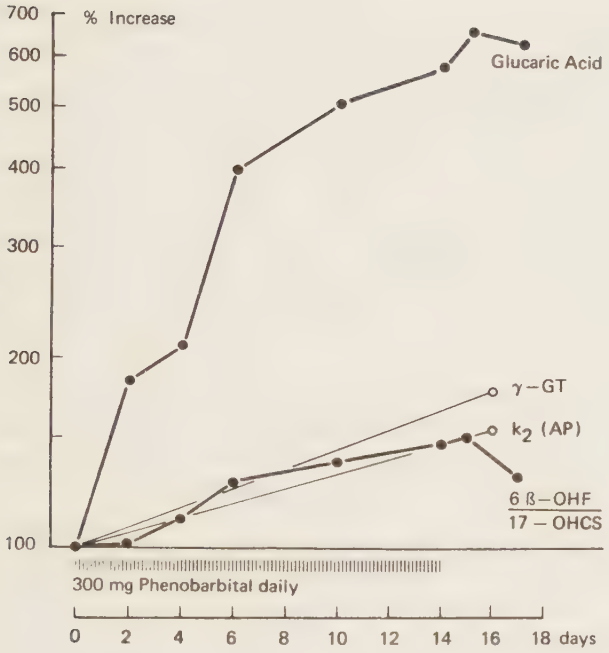

Abb. 18: Relativer Anstieg von "in vivo" Parametern der Aktivität arzneimittelmetabolisierender Enzyme nach 14 tätiger Behandlung mit 300 mg Phenobarbital/Tag (% Increase). Die unter Kontrollbedingungen erhaltenen Werte wurden mit 100 % bezeichnet. Die Kontrollwerte fürdie Zuckersäureausscheidung (Glucaric acid) und das Verhältnis von 6 ß-Hydroxycortisol und den 17 Hydroxycorticosteroiden (6 ß-OHF/17-OHCS) wurden aus den drei Tagen der Kontrollperiode ermittelt. Die Einteilung der Ordinate ist logarithmisch.
γ - GT = Gamma-Glutamyltranspeptidase
k_2 (AP) ist die Eliminationskonstante von Amidopyrin (Testdosis 600 mg per os)
(aus (63), S. 489)

D) DISKUSSION

I) Diskussion der Methoden

Marsh bestimmte mit der von ihm entwickelten enzymatischen Methode eine Ausscheidung von etwa 10 mg Zuckersäure pro Tag im Urin bei gesunden, unbehandelten Personen (46). Diese Methode ermöglicht die Bestimmung von Zuckersäurekonzentrationen von 1 µg/ml (≙ 4.0 nmol/ml). Mit der hier beschriebenen modifizierten enzymatischen Methode wurde aus den Werten der Kontrolltage aller Probanden eine mittlere Zuckersäureausscheidung von 32.7 µmol/Tag (S.D.: ± 15.9) berechnet. Die kleinste bestimmbare Zuckersäurekonzentration lag ebenfalls in der Größenordnung von 1 µg/ml Urin (s. Wiederfindung S. 63). Die Wiederfindung dem Urin zugesetzten Ca-D-Saccharats betrug 97.15 % (S.D.: = ± 8.98; n = 13).

Der Nachteil der enzymatischen Methode muß darin gesehen werden, daß neben der spezifischen Hemmung durch Saccharo (1:4) lacton eine unspezifische Hemmung durch vermehrte Ausscheidung von Substanzen auftreten kann, die ebenfalls pH-abhängig die Aktivität der ß-Glucuronidase hemmen, wie z.B. Mucat, Gluconat und Galacturonat (41).

Ishidate ermittelte mit der chemischen Methode bei Normalpersonen eine durchschnittliche Zuckersäureausscheidung von 18 mg/Tag (38). Okada und Mitarbeiter gelang es mit dieser Methode die Zukkersäurekonzentration im Serum zu messen (54). Die Wiederfindung von dem Urin zugesetzter Zuckersäure lag bei Ishidate zwischen 93 und 102 % (38). Ungenauigkeiten können bei diesem Verfahren während der colorimetrischen Bestimmung durch Substanzen auftreten, die ebenfalls zu Glyoxylsäure umgewandelt werden. Zu diesen gehören Weinsteinsäure, L-Gulon-, L-Ascorbin- und D-Glucuronsäure, die zwar normalerweise vor der Zuckersäure eluiert werden, manchmal aber doch in das Chromatogramm der Zuckersäure eindringen können (38). Für die routinemäßige Anwendung erwies sich diese Methode wegen der häufig notwendigen Regeneration des Ionenaustauschharzes als weniger geeignet.

Gangolli und Mitarbeiter (28) wiesen mit einer gaschromatographischen Methode (Gas-Flüssigkeitschromatographie) bei Normalpersonen Zuckersäureausscheidungen von 4.6 - 12 mg/Tag (n = 6; MW ± S.D. = 7.02 ± 2.74) nach, wobei Zuckersäuremengen bis zu 0.1 /ug bestimmt werden konnten. Die prozentuale Wiederfindung von dem Probandenurin zugesetztem Ca-D-Saccharat ergab 97 und 104 % (n = 2) (28). Die Nachteile der gaschromatographischen Methode können hier nur angedeutet werden. Sie erfordert aufwendige Abtrennung der Zuckersäure (28) oder eine nicht minder komplizierte Vorreinigung des Urins mit Ionenaustauschchromatographie (50). Deswegen und wegen der, zur Bestimmung notwendigen,teuren Apparatur ist diese Methode für die routinemäßige Anwendung weniger geeignet.

Die Vorteile der chemischen und gaschromatographischen Bestimmung ergeben sich aus der direkten Bestimmung der Zuckersäure, während mit der enzymatischen Methode nur die Hemmung der ß-Glucuronidase durch das Saccharo (1:4) lacton gemessen werden kann.

Der entscheidende Vorteil der enzymatischen Methode ist die einfach und schnell durchzuführende Bestimmung. Die durch diese Methode erreichte Genauigkeit ist für den Zweck, Veränderungen in der Aktivität arzneimittelabbauender Enzyme festzustellen, ausreichend, da signifikante Veränderungen voraussetzen, daß ein Mittelwert von 32.7 plus drei Standardabweichungen (15.9 /umol) überschritten werden muß (63).

II) Vergleich der Zuckersäureausscheidung aller Probanden unter Kontrollbedingungen mit den in der Literatur angegebenen

Die Zuckersäureausscheidung von vier Probandengruppen ergab unter Kontrollbedingungen keine großen Unterschiede (s. Abb.14). Die Werte reichen von 31.8 /umol Zuckersäure/Tag (Zs/Tag) als Mittelwert für die Placebogruppe, 31.4 /umol Zs/Tag für die Clemastinegruppe zu 32.4 bzw. 33.7 /umol Zs/Tag für die bei-

den Phenobarbitalgruppen. Die Einzelwerte der an den Kontrolltagen ausgeschiedenen Mengen differieren jedoch erheblich, von 6.58 bis 83.52 µmol Zs/Tag. Bei diesen starken Schwankungen spielen sicher genetische Faktoren eine Rolle (63). Von Bedeutung kann auch eine latente Induktion durch Chemikalien in der Umwelt, wie Insektizide (35) durch Bestandteile der Nahrung(5) und Medikamente sein. Der aus der Ausscheidung aller Kontrolltage berechnete Mittelwert 32.7 µmol Zuckersäure/Tag (S.D.=± 15.9) ist etwa doppelt so hoch wie der Wert, den Smith und Rawlins bei 9 Probanden mit der enzymatischen Methode von Marsh gefunden haben (15 ± 16 µmol/24 h) (65).

Die im folgenden aufgeführten Autoren bestimmten die Zuckersäure nach der von Marsh (46) beschriebenen enzymatischen Methode. Hunter und Mitarbeiter (35) stellten fest, daß die Zuckersäureausscheidung gut mit der täglichen Ausscheidung des Kreatinins (von 1 - 1.5 g/Tag) korreliert. Die Kreatininbestimmung ist dann angezeigt, wenn das genaue TagesvolumenUrin nicht bekannt ist, wobei µmol Zuckersäure/g Kreatinin gemessen werden. Auf diese Weise erhielten Cunningham und Evans (19) 9.5 µmol Zuckersäure/g Kreatinin (S.E.M. = 4.4; n = 20) mit der von Marsh beschriebenen Methode. Davidson und Mitarbeiter (20) fanden mit der gleichen Methode bei 23 unbehandelten Kontrollpersonen eine Zuckersäureausscheidung von 8.6 µmol/g Kreatinin (S.E.M. = 1.03). Werden die hier bestimmten Zuckersäurewerte auf eine Durchschnittsausscheidung von 1.5 g Kreatinin/Tag bezogen, so ergeben sich höhere Werte (etwa 22 µmol/g Kreatinin).

Diese höheren Werte erklären sich wahrscheinlich dadurch, daß die meisten Untersucher D-Glucaro (1:4) lacton als Referenzsubstanz für die ß-Glucuronidasehemmung heranzogen, jedoch für die Berechnung das durch Kochen gebildete Lacton als Zuckersäure angaben. Dafür spricht die gute Übereinstimmung der oben auf die Zuckersäure bezogenen angeführten Werte mit denen von Hunter und Mitarbeiter (34), die etwa 14 µmol D-gluaro (1:4) lacton/Tag ermittelten und von Sotaniemi, der bei 26 Kontrollpersonen eine Ausscheidung von 13.9±4.9 µmol (1:4) lacton erhielt (66). Da in dieser Arbeit als Referenzsubstanz gekochte Zuckersäure (Ca-D-Saccharat) diente, ist ein Vergleich mit den Werten der genannten Autoren dann möglich, wenn man berücksichtigt, daß durch Kochen bei saurem pH 30 % der Zuckersäure in das Lacton übergehen (41). March et al. bestimmten

mit einer modifizierten enzymatischen Methode mit Kaliumhydrogensaccharat als Referenzsubstanz bei männlichen Probanden eine durchschnittliche Ausscheidung von 98 µmol D-Zuckersäure pro Tag bei einer Streuung von 42 - 131 µmol (44).

Wie oben schon erwähnt, bestimmte Marsh (46) eine Zuckersäureausscheidung von ungefähr 10 mg/Tag. Die von Ishidate (38) mit chemischer Methode bestimmten 18 mg liegen etwas höher. Eine Umrechnung dieser Werte in molare Einheiten durch Division mit dem Molekulargewicht von Zuckersäure (Monokaliumsalz, 248.2) ergibt Werte zwischen 40 - 50 (Marsh) und 70 µmol Zuckersäure pro Tag.

Marsh (46), Aarts (1) und Fahim und Mitarbeiter (26) geben die Zuckersäureausscheidung ihrer Kontrollpersonen auch in "units of inhibitor" an. Eine "UI" entspricht bei den von Marsh (46) beschriebenen Versuchsbedingungen einer Konzentration von 24.1 nmol D-Zuckersäure/ml bzw. 5.06 µg (46). Wegen der in dieser Arbeit veränderten Versuchsbedingungen (anderes Enzym, Substrat, andere Inkubationszeiten usw.) ist ein absoluter Vergleich der hier angegebenen Werte mit denen der angeführten Autoren nicht möglich. Eine Hemmeinheit entspricht unter den veränderten Bedingungen 7.6 nmol Zs/ml Inkubat oder 3.5 µg/ml.

In "HE" ausgedrückt scheiden die Probanden der beiden Versuchsreihen etwa 4000/Tag aus. (Marsh (46) 16 Probanden: 2197 $\pm$ 425 UI/24 h; Aarts (1) 11 Probanden: 1400 $\pm$ 850 UI/24 h; Fahim (26) Frauen in der Menopause: 1000 - 2000 UI/24 h).

III) Vergleich der Werte der Zuckersäureausscheidung im Urin nach Phenobarbitalbehandlung mit denen der Literatur

Der in der Literatur beschriebene Anstieg der Zuckersäureausscheidung nachPhenobarbitalbehandlung konnte hier bestätigt werden. Aarts erhielt nach 7tägiger Behandlung mit 300 mg Phenobarbital einen 3 - 4fachen Anstieg der Ausscheidung an pH-abhängigem Hemmstoff im Urin (1). Ungefähr um den gleichen Faktor

nahm die Zuckersäureausscheidung nach 3tägiger Gabe von 2.2 mg Phenobarbital pro kg Körpergewicht bei 4 Frauen in der Postmenopause zu (26). Aarts stellte bei seinen Untersuchungen eine weitere Zunahme auch nach Absetzen des Medikaments und einen drei Wochen dauernden Abfall zu den Ausgangswerten fest (1). Auch hier ist eine Steigerung der Zuckersäureausscheidung nach Beendigung der Phenobarbitalbehandlung zu beobachten (s. Abb. 14), die mit der etwa nach einem Tag einsetzenden induktiven Wirkung der letzten Dosis erklärt werden kann. Der von Aarts (1) beschriebene langsame Abfall zu den Ausgangswerten ergibt sich wahrscheinlich aus der relativ langen Verweildauer des Phenobarbital im Organismus (Halbwertszeit: 3 - 4 Tage) (63).

Hunter und Mitarbeiter (34) erkannten bei Patienten, die mehrere Anticonvulsiva gleichzeitig erhielten, eine signifikante Korrelation zwischen der Tagesgesamtdosis und der Höhe der Zuckersäureausscheidung. Auch Sotaniemi hält es für möglich, anhand der im Urin ausgeschiedenen Menge Zuckersäure die Einnahme von Medikamenten mit induzierender Wirkung und das Ausmaß der Dosierung bestimmen zu können (66).

Hier konnte dagegen keine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung hergestellt werden. Durch eine Gabe von 300 mg Phenobarbital täglich scheint die mit einer Dosis erreichbare maximale induktive Wirkung erreicht zu sein. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung sollte jedoch unterhalb dieses Sättigungsbereiches erwartet werden. Es zeigte sich aber, daß bei gesunden Probanden offensichtlich die Dauer der Behandlung bei der Enzyminduktion eine wichtige Rolle spielt (63).

Um eine Induktion durch Phenobarbital und ähnlich wirksame Medikamente feststellen zu können, sollte die Bestimmung der Zukkersäure über einen längeren Zeitraum jeweils in Proben des 24-Stundenurins durchgeführt werden. Bei einer einzigen Bestimmung kann aufgrund der hier gewonnenen Daten nur ein Wert der über 80 µmol Zuckersäure/Tag (MW + 3 S.D.) liegt als sicherer Hinweis gewertet werden (63).

Davis (21) beschreibt ein reziprokes Verhältnis zwischen dem Anstieg der Zuckersäureausscheidung als Folge einer Enzyminduktion und der im Urin unter Kontrollbedingungen ausgeschiedenen Menge. Auch bei den hier aufgeführten Versuchen reagierten die meisten Probanden mit niedrigen Kontrollwerten empfindlicher auf Phenobarbital und schieden nach der Behandlung prozentual mehr aus als die mit hohen Ausgangswerten. Dadurch wurden teilweise die starken interindividuellen Schwankungen ausgeglichen, die vor der Behandlung bestanden. In der Phenobarbitalgruppe des Versuchs I zeigen 5 von 7 Probanden nach der Medikationsperiode Zuckersäureausscheidungen um 150 - 200 µmol/Tag, obwohl deren Kontrollwerte erheblich differierten (63).

IV) Mögliche Ursachen einer Erhöhung der Zuckersäureausscheidung.

Tierversuche lassen einen direkten Zusammenhang zwischen der Aktivität hydroxylierender Enzyme und der Zuckersäureausscheidung im Urin vermuten (1, 36, 53). Auch bei Menschen konnte man eine Erhöhung der Zuckersäureausscheidung nach Applikation von Pharmaka beobachten, die in der Lage sind, die Neusynthese hydroxylierender Enzyme in der Leber zu induzieren. Darunter befinden sich Anticonvulsiva, wie Phenobarbital (1, 66), Phetharbital (N-Phenylbarbital) (36), Diphenylhydantoin (19), weiterhin Amidopyrin (1), Progesteron (26), aber auch Insektizide, wie z.B. DDT (35).

Zuckersäure ist jedoch kein Produkt der in den oxydativen Stoffwechsel einbezogenen Enzyme, sondern entsteht beim Abbau von Glucuronsäure. Die Veränderung ihrer Ausscheidung im Urin gibt also nur eine Folgeerscheinung wieder, die u.a. durch eine Induktion hydroxylierender Enzyme hervorgerufen werden kann. Die einzelnen Schritte, die zu einer Steigerung der Ausscheidung führen, sind nicht bekannt. Der von uns gefundene siebenfache Anstieg kann jedenfalls nicht allein durch die Stimulierung hydroxylierender Enzyme hervorgerufen werden, die normalerweise um etwa 200 % erfolgt (s. Abb. S. 83).

Zur Erhöhung der im Urin ausgeschiedenen Menge Zuckersäure könnte eine Aktivitätssteigerung der ß-Glucuronidase beitragen, wie sie von Okada (54) im Serum epileptischer Patienten gefunden wurde, die mit Anticonvulsiva behandelt wurden. Eine dadurch verstärkte Hydrolyse von Glucuronidverbindungen könnte zu einem erhöhten Angebot an freier Glucuronsäure, dem Vorläufer der Zuckersäure, führen. Wir fanden zwar nach Phenobarbitalbehandlung einen signifikanten Anstieg der ß-Glucuronidaseaktivität im Serum, doch liegen diese Werte nur an der oberen Grenze der von Szasz (68) angegebenen Normalwerte (Männer: 0.35 - 1.32 mU/ml Serum). Es ist möglich, daß durch die lange Inkubationszeit in saurem Milieu (5 Std./pH 4.0) die Zuckersäure im Serum in ihre ß-Glucuronidase hemmende 1:4-Lactonform überging und so zu den relativ niedrigen Werten führte (s. S. 71).

Ein Zusammenhang zwischen der Steigerung der Zuckersäureausscheidung und der Aktivitätszunahme arzneimitteloxydierender Enzyme könnte durch Übereinstimmungen der Höhe der Zuckersäureausscheidung mit anderen "in vivo" Parametern, die direkt die Enzymaktivität anzeigen, z.B. 6 ß-Hydroxycortisolausscheidung bestätigt werden. Aufgrund der vielen Enzymsysteme des Arzneimittelstoffwechsels und der Vielzahl der Faktoren, die ihn beeinflussen, ist eine Korrelation verschiedener "in vivo" Parameter von vornherein nicht zu erwarten. Smith und Rawlins (65) fanden zwar Beziehungen zwischen einzelnen pharmakokinetischen Daten (Halbwertszeit, Clearance) von Antipyrin, Phenylbutazon und Warfarin, doch waren die Korrelationen so geringen Grades, daß sie diesen keine diagnostische Bedeutung beimaßen (65).

Überhaupt keine Beziehung konnten sie zu den "in vivo" Parametern, Gamma-Glutamyltranspeptidaseaktivität, 6 ß-Hydroxycortisol- und Zuckersäureausscheidung aufstellen. Auch Davis (21) fand keine signifikante Korrelation zwischen Änderung der Antipyrinhalbwertszeit und der Zunahme der Zuckersäureausscheidung. Cunningham und Evans (19) prüften die Beziehung zwischen den pharmakokinetischen Daten des oxydativ verstoffwechselten Acetanilid und der Höhe der Zuckersäureausscheidung nach Diphenyl-

hydantoingabe. Aus ihren Ergebnissen folgerten sie, daß die Änderung in der Ausscheidung pH-abhängigen Hemmstoffs im Urin kein zuverlässiger Indikator für Änderungen im Acetanilidmetabolismus (repräsentiert durch die Acetanilid-Clearance) sei.

Während die zitierten Befunde einen Zusammenhang zwischen Enzymen des Monooxygenasesystems und denen des Glucuronsäureabbaus zumindest fraglich erscheinen lassen, bestätigten andere den Wert der Zuckersäureausscheidung als Maß der Aktivität hydroxylierender Enzyme. Hunter und Mitarbeiter (34) fanden bei 12 gesunden Versuchspersonen nach einwöchiger Behandlung mit unterschiedlichen Dosen von Phenobarbital und Glutethimid eine signifikante ($r = -0.59$; $n = 12$; $p<0.05$) Korrelation zwischen Zuckersäureausscheidung und prozentualer Änderung der Antipyrinhalbwertszeit. Auch bei den hier beschriebenen Versuchen ergab sich unter Kontrollbedingungen eine solche Beziehung zwischen der Eliminationskonstanten von Amidopyrin und der Zuckersäureausscheidung ($r = 0.586$; $n = 18$; $p < 0.05$) (32).

Über welche Enzyme und, ob überhaupt eine Verbindung zwischen der Aktivität arzneimittelmetabolisierender Enzyme und der Steigerung der Zuckersäureausscheidung besteht, muß in weiteren Untersuchungen geprüft werden. Hierbei könnten kombinierte Untersuchungen der Zuckersäureausscheidung mit "in vitro" Parametern, also direkten Aktivitätsbestimmungen mikrosomaler Enzyme weiterhelfen.

Zur Klärung der Frage, inwieweit die Steigerung der Zuckersäureausscheidung als Folge einer Induktion mikrosomaler Enzyme oder als Folge unspezifischer Medikamenteneinflüsse auf die Leber anzusehen ist, könnte die Messung der Zuckersäureausscheidung bei Probanden nach Behandlung mit Pharmaka beitragen, die durch Kopplung an Glucuronsäure ausgeschieden werden, jedoch keine signifikante induktive Wirkung besitzen, z.B. Oxazepam. Ergänzend müßte untersucht werden, welchen Einfluß auf die Zuckersäureausscheidung Medikamente besitzen, die zwar induzierend wirken, aber nicht glucuronidiert werden, wie z.B. Äthanol.

V) Diagnostische Aussagekraft von "in vivo" Parametern

Wie in der Einleitung beschrieben, sollen "in vivo" Parameter zur Beurteilung der Aktivität arzneimittelmetabolisierender Enzyme herangezogen werden, um eventuell einen durch Induktion bedingten, beschleunigten Abbau eines Medikaments erkennen zu können. Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß durch Messung verschiedener "in vivo" Parameter die Aktivitätsänderung mikrosomaler Enzyme nach Phenobarbitalbehandlung gut beurteilt werden kann. Aussagen über das Ausmaß und die Geschwindigkeit mit der ein bestimmtes Medikament abgebaut und ausgeschieden wird, sind aufgrund der Vielfalt hydroxylierender Enzyme und anderer Faktoren, die Abbau und Elimination von Pharmaka beeinflussen, meist nicht möglich. Zu diesen Faktoren gehören die Bindung eines Medikamtes an Plasma- und Gewebeproteine, die Nierenfunktion des Patienten, dessen Leberfunktion und Leberdurchblutung. Am ehesten kann die Eliminationskinetik eines Medikaments bei einem Patienten durch Verabreichung einer Testsubstanz bestimmt werden, z.B. Amidopyrin. Um aus den Daten der Testsubstanz Schlüsse für die Elimination eines anderen Medikaments ziehen zu können, muß das fragliche Pharmakon der Testsubstanz in der Art des Abbaus, in der Plasmabindung und Verteilung im Organismus sehr ähnlich sein. (65).

Vorteile der "in vivo" Untersuchungen liegen in der geringen Belastung für den Patienten und der Berücksichtigung nicht enzymatischer Faktoren. Mit "in vitro" Tests sind dagegen gezielte Aktivitätsbestimmungen eines oder mehrerer mikrosomaler Enzyme möglich. Eine Aussage über die Kapazität des Arzneimittelstoffwechsels eines Patienten läßt sich am besten durch Kombination von "in vivo" und "in vitro" Untersuchungen treffen.

Ein Vergleich der in dieser Arbeit verwendeten "in vivo" Parameter ergibt, daß die Höhe der Zuckersäureausscheidung am frühesten und am deutlichsten Aktivitätsänderung mikrosomaler Enzyme nach Phenobarbitalbehandlung anzeigt. Weitere Vorteile dieses Parameters sind die einfache und schnelle Nachweismethode

und die geringe Belastung für den Patienten. Zur Bestimmung wird nur ein 24-Stundenurin benötigt. Außerdem muß keine Testsubstanz verabreicht werden, die eventuell die Messung stören könnte. Allerdings bedeutet eine erhöhte Zuckersäureausscheidung bei Patienten mit gestörtem Kohlenhydratstoffwechsel, z.B. Diabetes mellitus, nicht unbedingt Folge einer Enzyminduktion (21). Sehr niedrige Ausscheidungswerte können auch durch eingeschränkte Nahrungszufuhr bedingt sein (66) was differentialdiagnostisch zu berücksichtigen ist.

E) Zusammenfassung

1) Untersucht wurde die Bedeutung der Veränderung der Zuckersäureausscheidung im Urin als möglicher "in vivo" Parameter der Aktivität von Enzymen des Arzneimittelstoffwechsels in der Leber des Menschen nach Behandlung mit Phenobarbital, Clemastine (Tavegil^{R}) und Placebo.

2) Weiterhin wurde die Aktivität der ß-Glucuronidase im Serum und ihre Veränderung nach Einnahme obengenannter Medikamente gemessen.

3) Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen zweier Versuchsreihen, von denen eine als Doppelblindstudie mit 19 männlichen Probanden durchgeführt wurde. Hierbei wurden sieben Probanden 14 Tage lang mit 300 mg Phenobarbital pro Tag, sechs mit 6 mg Clemastine (Tavegil^{R}) pro Tag und sechs mit entsprechenden Placebos behandelt. An der zweiten Versuchsreihe nahmen fünf männliche Probanden teil, die über fünf Tage 500 mg Phenobarbital pro Tag erhielten.

4) Die Zuckersäurebestimmung im Urin dieser Probanden geschah mittels einer Modifikation der von Marsh entwickelten enzymatischen Methode. Es wird die Hemmung der durch ß-Glucuronidase (von helix pomatia) katalysierten Hydrolyse von p-Nitrophenylglucuronid (0.938 mM) in saurem Milieu (Acetatpuffer, pH 4.5) durch Saccharo (1:4) lacton gemessen. Dieses bildet sich aus der im Urin vorhandenen Zuckersäure nach Einstellung des Urins auf pH 2 nach 40-minütigem Kochen. Als Referenzsubstanz für Saccharo (1:4) lacton wurde Ca D-Saccharat verwendet.

Durch die von Marsh verschiedenen Reagenzien und dadurch veränderten Versuchsbedingungen, ist eine einfache, billigere und schnellere Bestimmung der Zuckersäure im Urin möglich.

5) Mit dieser Methode wurde bei den 23 Probanden der beiden Versuchsreihen unter Kontrollbedingungungen eine Zuckersäureausscheidung von 32.7 µmol/Tag (S.D. = 15.9) bestimmt. Bei 7 Probanden, die 300 mg Phenobarbital pro Tag erhielten, wurde nach

14 tägiger Behandlung ein Anstieg der Zuckersäureausscheidung um den Faktor 5.72 beobachtet. Die Probanden, die Placebo bzw. Tavegil bekamen, zeigten keine signifikante Änderung ihrer Zukkersäureausscheidung. Die 5 Probanden, die mit 500 mg Phenobarbital/Tag behandelt wurden, schieden um den Faktor 3.24 mehr Zuckersäure als vor der Behandlung aus.

6) Bei den gegebenen Phenobarbitaldosierungen, 300 und 500 mg, ergab sich keine Abhängigkeit der Höhe der Zuckersäureausscheidung von der Einzeldosis, wohl aber von der Dauer der Verabreichung

7) Als Hinweis auf eine Induktion kann bei einer einzelnen Zuckersäurebestimmung ein Wert über der Signifikanzschranke von 80.4 µmol/Tag (Mittelwert unter Kontrollbedingungen plus drei Standardabweichungen) gewertet werden.

8) Die Zuckersäureausscheidung stieg bei Probanden mit geringen Werten unter Kontrollbedingungen prozentual stärker an, als bei denen mit hohen Ausgangswerten.

9) Die Aktivität der ß-Glucuronidase im Serum war bei sechs, der mit Phenobarbital behandelten Probanden nach der Medikation signifikant erhöht.

10) Die Veränderung der Zuckersäureausscheidung gibt, bei Vergleich mit anderen "in vivo" Parametern am frühesten und am deutlichsten eine Zunahme der Aktivität der Enzyme des Arzneimittelstoffwechsels durch Phenobarbitalbehandlung an.

Aufgrund der Vielfalt der arzneimittelmetabolisierender Enzyme ist dennoch eine Kombination mehrerer "in vivo" Parameter wünschenswert, um deren Aktivität beurteilen zu können.

11) Der Zusammenhang zwischen der Aktivität hydroxylierender Enzyme und der Zuckersäureausscheidung, die weitgehend von der Geschwindigkeit konjugierender Enzyme abhängig ist, wird diskutiert. Eine endgültige Klärung bleibt, trotz auch in diesen Untersuchungen vorhandenerKorrelation zu beweisen.

C) LITERATURVERZEICHNIS

1. AARTS, E.M.:
Evidence for the function of D-glucaric acid as an indicator for drug induced enhanced metabolism through the glucuronic acid pathway in man
Biochem. Pharmacol., 14, 359 - 363, (1965)

2 AARTS, E.M.:
Differentiation of the barbiturate stimulation of the glucuronic acid pathway from "de novo" enzyme synthesis
Biochem. Pharmacol., 15, 1469 - 1477 (1966)

3 AARTS, E.M.:
D-glucaric acid excretion as a test for hepatic enzyme induction
The Lancet, , April 24 , 859, (1971)

4 AARTS, E.M., HINNEN-BOUWMANS, C.:
Common properties of D-glucuronolactone and aldehyde dehydrogenase from the soluble fraction of rat liver
Biochem. et. Biophys. Acta, 268, 21 - 29 (1972)

5 BASU, T.K., DICKERSON, J.W.T.:
Inter-relationships of nutrition and the metabolism of drugs
Chem.-Biol. Interactions, 8, 193 - 206 (1974)

6 BERGMEYER, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim Bergstraße, Bd. I, 2. Auflage, S.419 (1970)

7 Biochemica Information, I
Boehringer, Mannheim GmbH, S. 103 (1973)

8 BRILL, R.P., MILLER, J.A. MILLER, E.C.:
The metabolism of methylated aminoazo dyes
IV. Dietary factors enhancing demethylation in vitro
Journal biol. Chem. 209, 211 - 222 (1954)

9 CHEN. W.,VRINDTEN, P.A., DAYTON, P.G., BURNS, J.J.:
Accelerated aminopyrine metabolism in human subjects pretreated with phenylbutazone
Life sci, 2, 35 (1962)

10 COLTORTI, M., DI SIMONE, A., DI CESARE, D., RINALDI, M.:
Effect of phenobarbital administration on liver and plasma gamma-glutamyl-transpeptidase: Clinical and experimental investigations
Acta vitaminologica et enzymologica, 27, 217 - 222 (1973)

11 CONNEY, A.H., BURNS, J.J.:
Stimulatory effect of foreign compounds on ascorbic acid biosynthesis and on drug-metabolizing enzymes
Nature, 184, 363 - 364, ,(1954)

12 CONNEY, A.H., DAVISON, C., GASTEL, R., BURNS, J.J.:
Adaptive increases in drug-metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs
J. Pharmacol. exptl. therap., 130, 1 - 8 (1960)

13 CONNEY, A.H., BRAY, G.A., EVANS, C., BURNS, J.J.:
Metabolic interactions between l-ascorbic acid and drugs
Annals New York Academy of Sciences, 92, 115 - 127 (1961)

14 CONNEY, A.H., GILMAN, A.G.:
Puromycin inhibition of enzyme induction by 3-methylcholanthrene and phenobarbital
Journal biol. Chem. 238, 3682 - 3685 (1963)

15 CONNEY, A.H.
Pharmacological implications of microsomal enzyme induction
Pharmacological Reviews, 19, No 3, 317 - 366 (1967)

16 COOPER, D.Y., LEVIN, S., NARASIMHULU, S., ROSENTHAL, O., ESTABROOK, R.W.:
Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems
Science 147, 400 - 402, (1964)

17 CRAWFORD, S.J., RUDOFSKY, S.:
Some alterations in the pattern of drug metabolism associated with pregnancy, oral contraceptives and the newly born
Brit. J. Anaesth. 38, 446 - 453 (1966)

18 CUCINELL, S.A., CONNEY, A.H., SANSUR, M.,BURNS, J.J.:
Drug interactions in man
1. Lowering effect of phenobarbital on plasma levels of bishydroxycumarin (Dicumarol) and diphenylhydantoin (Dilantin)
Clinical Pharmacol. and Therapeutics 6, 4 420-429 (1965)

19 CUNNINGHAM, J.L., EVANS, P.D.A.:
Urinary D-glucaric acid excretion and acetanilide pharmacokinetics before and during diphenylhydantoin administration
Europ. J. Clin. Pharmacol. 7, 387 - 391 (1974)

20 DAVIDSON, D.C., McINTOSH, W.B., FORD, J.A.:
Assessment of plasma glutamyl transpeptidase activity and urinary D-glucaric acid excretion as indices of enzyme induction
Clinical Science and Molecular Medicine, 47, 279-283 (1974)

21 DAVIS, M.:
Urinary D-glucaric acid excretion as an index of hepatic microsomal enzyme induction
(Michael Davis - the liver unit/Kings College Hospital and Medical School - London SE 5 8 RX/Referat in Montecattini (1974)

22 DIXON, M., WEBB, E.C.: "Enzymes"
S. 21 - 24
First published 1958 by Longmans, Green and Co, London New York, Toronto

23 DOCUMENTA GEIGY, Wissenschaftliche Tabellen
S. 32-35; 7. Auflage
herausgegeben von DIEM, K., LEITNER, C.

24 DUTTON, G.J.:
Glucuronide-forming enzymes
Hdb. exp. Pharmacol., XXVIII/2 378 - 400
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1971

25 ENKLEWITZ, M., LASKER, M.:
The origin of l-xyloketose (urine pentose)
Journal biol. Chem., 110, 443 - 456 (1935)

26 FAHIM, M.S., HALL, D.G., FAHIM, Z.:
Urinary D-glucaric acid
Am. J. Obst. a.Gynec., 105, 124 - 126 (1969)

27 FISHMAN, W.H., KATO, K., ANSTISS, C.L., GREEN, S.:
Human serum ß-glucuronidase; its measurement and some of its properties
Clinica Chimica Acta, 15, 435 - 447 (1967)

28 GANGOLLI, S.D., LONGLAND, R.C., SHILLING, W.H.:
A gas-liquid chromatographic method for the determination of D-glucaric acid in urine
Clinica Chim. Acta, 50, 237 - 243 (1974)

29 GELBOIN, H.V.:
Mechanisms of induction of drug metabolism enzymes
Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXVIII/2, S. 431
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1971

30 HAMILTON, G.A.:
Chemical Models and Mechanisms for Oxygenases
Molecular Mechanisms for Oxygen Activation, S. 405
edited by Osamu Hayaishi - Academic Press New York - London (1974)

31 HILDEBRANDT, A., REMMER, H., ESTABROOK, R.W.:
Cytochrome P 450 of liver microsomes - one pigment or many
Biochem. and Biophys. Research Communications 30, 607 - 612 (1968)

32 HILDEBRANDT, A.G., ROOTS, I., SPECK, M., SAALFRANK, K., KEWITZ, H.:
Evaluation of "in vivo" parameters of drug metabolizing enzymes activity in man following clemastine, phenobarbital or placebo administration
Europ. J. clin. Pharmacol. 8, 327 - 336 (1975)

33 HOLLMANN, S., TOUSTER, O.:
Alterations in tissue levels of uridine diphosphate glucose dehydrogenase, uridine diphosphate glucuronic acid pyrophosphatase and glucuronyl transferase induced by substances influencing the production of ascorbic acid
Biochimica et Biophysica Acta, 62, 338 - 352 (1962)

34 HUNTER, J., CARELLA, M., WILLIAMS, R., MAXWELL, J.D., STEWART, D.A.:
Urinary D-glucaric-acid excretion as a test for hepatic enzyme induction in man
The lancet, 572 - 575 (March 20 1971)

35 HUNTER, J., MAXWELL, J.D., STEWART, D.A., WILLIAMS, R., ROBINSON, J., RICHARDSON, A.:
Increased hepatic microsomal enzyme activity from occopational exposure to certain organochlorine pesticides
Nature, 237, 399 - 401 (1972)

36 HUNTER, J., MAXWELL, D., STEWART, D.A., WILLIAMS, R.:
Urinary D-glucaric acid excretion and total liver content of cytochrome P-450 in guinea-pigs: Relationship during enzyme induction and following inhibition of protein synthesis
Biochem. Pharmacol. 22, 743 - 747 (1973)

37 HUNTER, J., BURNHAM, W.R., CHASSEAUD, L.F., DOWN, W.:
Changes in D-glucaric acid excretion in relation to alterations in the rate of antipyrine metabolism in man
Biochem. Pharmacol. Vol 23, 2480 - 2483 (1974)

38 ISHIDATE, M., MATSUI, M., OKADA, M.:
Biochemical studies on glucaric acid and glucuronic acid
1. Quantitative chemical determination of D-glucaric acid in urine
Analytical Biochemistry 11, 176 - 189 (1965)

39 KHYM, J.X., ZILL, L.P.:
The separation of sugars by ion exchange
Journal org. Chemistry, 74, 2090 (April 20 1952)

40 KUNTZMAN, R., JACOBSON, J., LEWIN, W., CONNEY, A.H.:
Stimulatory effect of N-Phenylbarbital (Phetarbital) on cortisol hydroxylation in man
Biochem. Pharm. 17, 565 - 571 (1968)

41 LEVY, C.A.:
The preparation and properties of ß-glucuronidase
4. Inhibition by sugar acids and their lactones
Biochem. Journal 52, 464 - 471 (1952)

42 LONGENECKER, H.E., FRICKE, H.H., KIND, C.G.:
The effect of organic compounds upon vitamin C synthesis in the rat
Journal biol. Chem., 135, 497 - 509 (1940)

43 MANNERING, G.J.:
Inhibition of drug metabolism
Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXVIII/2, S. 452
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1971)

44 MARCH, J., TURNER, W.T., SHANLEY, J., FIELD, J.:
Values for urinary excretion of D-glucaric acid by normal individuals
Clin. Chemistry, 20, 9, 1155 - 1158 (1974)

45 MARSELOS, M., HÄNNINEN, O.:
Enhancement of D-glucuronolactone and acetaldehyde dehydrogenase activities in the rat liver by inducers of drug metabolism
Biochem. Pharmacol., 23, 1457 - 1466 (1974)

46 MARSH, C.A.:
Metabolism of D-glucuronolactone in mammalian systems-
Identification of D-glucaric acid as a normal constituent of urine
Biochem. Journal 86, 77 - 86 (1963)

47 MARSH, C.A.:
Metabolism of D-glucuronolactone in mammalian systems
2. Conversion of D-glucuronolactone into D-glucaric acid by tissue preparations
Biochem. Journal, 87, 82 - 90 (1963)

48 MARSH, C.A.:
Metabolism of D-glucuronolactone in mammalian systems -
Inhibitory properties of the products of D-glucuronolactone-dehydrogenase action
Biochem. Journal 99, 22 - 27 (1966)

49 MARSH, C.A., REID, L.M.:
Changes in D-glucaric acid excretion induced by stimulators of ascorbic acid synthesis
Biochimica et Biophysica Acta, 78, 726 - 728 (1963)

50 MATSUNAGA, I., IMANARI, T., TAMURA, Z.:
Simultaneous determination of urinary uronic acids and saccharic acids by gas chromatography
Chem. Pharm. Bull., 18, No 12, 2535 - 2543 (1970)

51 NAYAK, R.K., SMYTH, R.D., CHAMBERLAIN, J.H., POLK, A., DeLONG, A.F., HERCZEG, T., CHEMBURKAR, P.B., JOSLIN, P.S., REAVEY-CANTWELL, N.H.:
Methaqualone pharmacokinetics after single and multiple-dose administration in man
Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, 2, 107 - 121 (1974)

52 NIMMO-SMITH, R.H.:
p-nitrophenyl-ß-glucuronide as substrate for ß-glucuronidase
Biochimica Biophysica Acta, 50, 166 - 169 (1961)

53 NOTTEN, W.R.R., HENDERSON, R.Th.:
Effect of disulfiram on the urinary D-glucaric acid excretion and activity of some enzymes involved in drug metabolism in guinea-pig
Arch. int. Pharmacodyn., 205, 199 - 208 (1973)

54 OKADA, M., MATSUI, M., KAIZU, T., and EBE, F.:
Studies on the glucaric acid pathway in the metabolism of D-glucuronic acid in mammals
V. Stimulatory effect of Diphenylhydantoin and Phenobarbital on the D-glucaric acid synthesis in man
Chem. Pharm. Bull. 17, 2625 - 2628 (1969)

55 POGELL, B.M., LELOIR, L.F.:
Nucleotide activation of liver microsomal glucuronidation
J. of Biol. Chem. 38, No 2 293 - 298 (1961)

56 PREISS, J., HILZ, H.:
Isolation and partial characterisation of ß-glucuronidase from murine mastocytoma cells
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie 352, 947 - 953 1971)

57 RADZIALOWSKI, F.M., BOUSQUET, W.F.:
Circadian rhythm in hepatic drug metabolizing activity in the rat
Life Sci., 6, 2545 - 2548 (1967)

58 RAUEN, H.M.:
Biochemisches Taschenbuch, II. Teil, S. 95
Springer-Verlag (1964)

59 REMMER, H.:
Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 235, 279 - 290 (1959)

60 REMMER, H., MERKER, H.J.:
Drug-induced changes in the liver endoplasmatic reticulum: Association with drug-metabolizing enzymes
Science, 142, 1657 - 1658 (dec. 1963)

61 REMMER, H., MERKER, H.J.:
Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmatic reticulum and drug-metabolizing enzymes
Annals New York Academie of Sciences 123, 79 - 97 (1965)

62 REMMER, H.:
Die Elimination von Arzneimitteln durch enzymatischen Abbau in der Leber
Internist 8, 413 - 418 (1966)

63 ROOTS, I., SAALFRANK,K., HILDEBRANDT, A.G.:
Comparison of methods to study enzyme induction in man.In: Cytochromes P-450 and b_5 - Edited by D.Y. COOPER, O. ROSENTHAL, R. SNYDER and C. WITMER 485 - 502 (1974)

64 SJÖQUIST, F., VON BAHR, C.:
Interindividual differences in drug oxidation: Clinical importance
Drug Metabolism and Disposition 1, , 469 - 482 (1973)

65 SMITH, S.E., RAWLINS, N.D.:
Prediction of drug oxidation rates in man: Lack of correlation with serum gamma-glutamyl transpeptidase and urinary excretion of D-glucaric acid and 6 ß-hydroxycortisol
Europ. J. clin. Pharmacol. 7, 71 - 75 (1974)

66 SOTANIEMI, E.A., MEDZIHRADSKY, F.:
Glucaric acid as an indicator of use of enzyme-inducing drugs
Clinical Pharmacol. and Therapeutics 15, , 417 - 423 (1974)

67 SOUTHERN, A.L., GORDON, G.G., TOCHIMOTO, S., KRIKUN, E., KRIEGER, D., JACOBSON, M., KUNTZMAN, R.:
Effect of N-Phenylbarbital (Phetarbital) on the metabolism of Testosterone and Cortisol in man
J. Clinical Endocrinology, 29, 251 - 256 (1969)

68 SZASZ, G.:
Die Bestimmung der ß-Glucuronidase Aktivität im Serum mit p-Nitrophenyl-Glucuronid
Clinica Chimica Acta, 15, 275 - 282 (1967)

69 ULLRICH, V.:
Enzymatische Hydroxylierungen mit molekularem Sauerstoff
Angewandte Chemie, 15, 689 - 724 (1972)

70 WILLIAMS, R.T.:
Introduction: Pathways of drug metabolism
Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXVIII/2, 226
Editors B.B. Brodie and J. R.Gillette, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1971)

71 WINDORFER, A.:
Steigerung der Glucuronidierungsrate in der Neugeborenenperiode durch therapeutische Phenobarbitaldosen
Z. Kinderheilk. 113, 33 - 41 (1972)

Herrn Prof. Dr. A.G. H i l d e b r a n d t danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und für sein großes Interesse an meiner Arbeit. Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. I. P o o t s für seine stete Hilfsbereitschaft und wertvollen Anregungen.

Lebenslauf

Am 22.3.1950 wurde ich in Rehau/Oberfranken als Sohn des kaufmännischen Angestellten Eduard Saalfrank und dessen Ehefrau Charlotte geboren.

Von September 1956 bis Juli 1960 besuchte ich die Volksschule in Rehau, ab September 1960 die Oberrealschule in Selb. Nach dem achten Schuljahr wechselte ich auf den neusprachlichen Zweig der Schule, an dem ich 1969 mit gutem Erfolg meine Reifeprüfung ablegte.

Das Studium der Humanmedizin begann ich im Wintersemester 1969/70 an der Ludwig-Maximilian-Universität in München. Dort bestand ich im Sommer 1970 die naturwissenschaftliche und im Frühjahr 1972 die ärztliche Vorprüfung. Zum Sommersemester 1973 erfolgte der Wechsel an die Freie Universität Berlin, an der ich von März bis August 1975 die ärztliche Prüfung ablegte.

Von November 1975 bis Februar 1976 war ich als Medizinalassistent im Institut für Klinische Pharmakologie tätig. Während der übrigen Medizinalassistentenzeit arbeitete ich an der Chirurgischen Abteilung des Martin-Luther-Krankenhauses und an der II. Inneren Abteilung des Rudolf-Virchow-Krankenhauses.

Seit Februar 1977 bin ich als Assistenzarzt an der Chirurgischen Abteilung des Evangelischen Waldkrankenhauses Spandau beschäftigt.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt, außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt und von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Dissertationsdruck Fred Höpfner
Pestalozzistr. 106 (Ecke Bleibtreustr) 1 Berlin 12
312 88 85
313 81 98